

Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
der Philipps-Universität Marburg



**Molekulare Autopsie der nah verwandten
ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *Bacillus subtilis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Laura Teichmann
aus Hagen a.T.W.

Marburg 07/2018

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Oktober 2015 bis Juni 2018 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:
20.09.2018

Gutachter dieser Arbeit waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gert Bange

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2018

In Zusammenarbeit mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikation veröffentlicht bzw. Manuskripte vorbereitet:

Teichmann, L., Chen, C., Hoffmann, T., Smits, S.H.J., Schmitt, L., and Bremer, E. (2017) From substrate specificity to promiscuity: hybrid ABC transporters for osmoprotectants. *Mol Microbiol* **104**: 761–780.

Teichmann, L., Kümmel, H., Warmbold, B., and Bremer, E. (2017) OpuF – a new *Bacillus* compatible solute ABC transporter with a substrate binding protein fused to the transmembrane domain. *Appl Environ Microbiol* **84**:e01728-18.

Peherstorfer, S. *, **Teichmann, L.***, Broy, S., Chen, C., Pittelkow, M., Hoffmann, T., Rensing, S.A., Smits, S.H.J., Schmitt, L., and Bremer, E. (2018) Reprogramming the substrate specificity of an ABC import system by a single amino acid substitution in its cognate ligand binding protein. (*in preparation*)

*gleichwertige Autorenschaft

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung.....	11
2.1 Anpassung von <i>B. subtilis</i> an osmotische Stressbedingungen	11
2.1.1 Kompatible Solute	12
2.1.2 Aufnahme von kompatiblen Soluten	13
2.1.3 Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i>	14
2.1.4 Endogene Synthese von Glycin Betain in <i>B. subtilis</i> : die Rolle des MarR-Typ Regulators GbsR.....	14
2.2 Die ABC-Transporter OpuB und OpuC aus <i>B. subtilis</i>	18
2.2.1 Aufbau und Mechanismus von ABC-Transportern	18
2.2.2 Die Osmolyt Aufnahmesysteme OpuB und OpuC aus <i>B. subtilis</i>	21
2.2.3 Die aromatische Substratbindetasche – Ein Merkmal von SBPs	23
2.3 Zielsetzung der Arbeit.....	26
3. Material & Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien und Enzyme	27
3.1.2 Medien	27
3.1.3 Medienzusätze	28
3.1.4 Kompatible Solute	28
3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	29
3.2.1 Bakterienstämme	29
3.2.2 Plasmide.....	32
3.2.3 Oligonukleotide	33
3.3 Mikrobiologische Methoden.....	35
3.3.1 Sterilisation	35
3.3.2 Kultivierung von Bakterien.....	35
3.3.3 Ermittlung der Zelldichte.....	35
3.4 Molekularbiologische und genetische Methoden	35
3.4.1 Präparation, Aufarbeitung und Klonierungsverfahren von DNA	35
3.4.2 Transformation von Bakterien	37
3.5 Biochemische Methoden.....	39
3.5.1 Nachweis der Amylase-Aktivität.....	39
3.5.2 Bestimmung von Expressionslevel mit Hilfe von Reporterfusionen	39

3.5.3	Bestimmung des intrazellulären Prolin-Pools.....	40
3.5.4	Bestimmung von intrazellulären Solut-Pools mittels LC-ESI-MS.....	41
3.5.5	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	41
3.5.6	Proteinreinigung via Strep-Tag-Affinitätschromatografie.....	42
3.5.7	SDS-PAGE	42
3.5.8	Western Blot und Immunodetektion.....	43
3.5.9	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	44
3.5.10	Transport-Assay mit ¹⁴ C markierten Substraten	45
3.5.11	¹³ C-NMR.....	45
3.6	Bioinformatische Methoden.....	46
4.	Ergebnisse.....	47
4.1	Funktionelle hybride ABC-Transporter aus OpuB und OpuC.....	47
4.1.1	Konstruktion und physiologische Charakterisierung der hybriden Transportsysteme	47
4.1.2	Kinetische Parameter von OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC	52
4.2	<i>in-vivo</i> Austausch der Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC	54
4.3	Aminosäure an Position 74 der reifen SBPs OpuBC und OpuCC determiniert das Substratspektrum des ABC Transporters	58
4.3.1	Evolution von OpuB und OpuC: Verbreitung von OpuB und OpuC in der Gattung <i>Bacillus</i>	58
4.3.2	Aminosäuresequenzvergleich von OpuBC und OpuCC.....	61
4.3.3	Physiologische Charakterisierung der Mutanten OpuBC-D ⁷⁴ T und OpuCC-T ⁷⁴ D.....	65
4.3.4	Kinetische Parameter der Mutanten OpuBC-D ⁷⁴ T und OpuCC-T ⁷⁴ D..	68
4.3.5	Einblick in die Bindungstasche der Mutante OpuBC-D ⁷⁴ T.....	70
4.4	OpuF - ein neuartiger fusionierter ABC-Transporter für Osmoprotektiva	72
4.4.1	Phylogenetische Verbreitung des fusionierten ABC-Transporters.....	72
4.4.2	Aufbau und Topologie von OpuF	77
4.4.3	Charakterisierung ausgewählter OpuF Transporter im heterologen <i>B.</i> <i>subtilis</i> System	81
4.4.4	Einfluss der Mutation OpuFB-T ²⁹⁶ D auf die Substratspezifität des OpuF Transporters	84
4.5	Charakterisierung von GbsR mit Hilfe eines Suppressor-Screens.....	85
4.5.1	Effizienzsteigerung durch Suppressor-Screen und Physiologie einiger Suppressor Mutanten	85
4.5.2	Erstellung einer Suppressoren Stammsammlung	91
4.5.3	Wachstumsvorteil der Suppressoren unter hyperosmotischen Bedingungen	92

4.5.4	Steigerung der maximalen Transportgeschwindigkeit.....	95
4.5.5	Einfluss der Mutationen auf die DNA-Bindung	97
4.5.6	Einfluss der Suppressor Mutationen auf die <i>gbsAB</i> -Expression	100
4.6	Homocholin – ein neues Osmostressprotektivum für <i>B. subtilis</i>	102
4.6.1	OpuB und OpuC vermitteln den Transport von Homocholin.....	103
4.6.2	Homocholin selbst besitzt keine osmoprotektiven Eigenschaften und muss weiter oxidiert werden	110
4.6.3	Homobetain Synthese aus dem Vorläufer Homocholin über GbsAB	114
4.6.4	Homocholin als Induktor für GbsR.....	117
5.	Diskussion und Ausblick	121
5.1	Substratspezifitäten der nah verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC..	121
5.2	Der neuartige Osmolyt ABC Transporter OpuF	126
5.3	GbsR – Mutationen in verschiedenen Domänen des Repressors führen zur Derepression des <i>opuB</i> Operons	129
5.4	Der Mechanismus der Osmoprotektion mit Hilfe des Cholin-Derivats Homocholin.....	132
6.	Literatur	137
7.	Anhang.....	149
8.	Erklärung	165

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die fünf Opu Transportsysteme aus <i>B. subtilis</i>	13
Abbildung 2: Regulation der Cholin Aufnahme über OpuB und der Glycin Betain Synthese.	16
Abbildung 3: Struktur der DNA-Bindeproteine Mj223 aus <i>M. jannaschii</i> und GbsR aus <i>B. subtilis</i> ...	18
Abbildung 4: Übersicht der verschiedenen ABC Transportertypen.....	19
Abbildung 5: Schematische Übersicht über den Transportvorgang von Substraten in ABC Transportern.	21
Abbildung 6: Substratspezifitäten der ABC Transporter OpuB und OpuC.	23
Abbildung 7: Die Substratbindeproteine OpuBC und OpuCC der ABC Transporter OpuB und OpuC aus <i>B. subtilis</i>	25
Abbildung 8: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen.	49
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC.....	50
Abbildung 10: Detektion der Proteine OpuBC und OpuCC mittels Western Blot und Immunodetektion.	51
Abbildung 11: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums.	52
Abbildung 12: Detektion von OpuCC in verschiedenen <i>B. subtilis</i> Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion.	55
Abbildung 13: Osmoprotektionsassay ohne und mit ektopischer Expression des Gens <i>opuCC</i> in verschiedenen <i>B. subtilis</i> Stämmen.	57
Abbildung 14: Substratspektrum des OpuB Transportsystems unter hyperosmotischen Bedingungen ohne und mit ektopischer Expression des einzelnen <i>opuCC</i> Gens.....	58
Abbildung 15: Phylogenetische Verbreitung von OpuB und OpuC ABC Transporter in der Gattung <i>Bacillus</i>	60
Abbildung 16: Aminosäuresequenzvergleich der OpuBC-Typ und OpuCC-Typ aus den 29 <i>Bacillus</i> Stämmen, die jeweils einen OpuB-Typ und einen OpuC-Typ ABC Transporter besitzen.	62
Abbildung 17: Übersicht der Gruppierung von OpuBC- und OpuCC-Typ SBPs.....	64
Abbildung 18: Architektur der Substratbindetasche der SBPs OpuBC und OpuCC	65
Abbildung 19: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums.	67
Abbildung 20: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme radioaktiv markierter kompatibler Solute über den OpuB _{wt} und OpuB-D ⁷⁴ T ABC Transporter	68
Abbildung 21: Architektur der Substratbindetasche der Mutante OpuBC-D ⁷⁴ T.....	70
Abbildung 22: Oberflächen- und Ladungsansicht der Substratbindetasche der Proteine OpuBC, OpuCC und OpuBC-D ⁷⁴ T	72
Abbildung 23: Genetische Organisation von <i>opuFAB</i> und schematische Darstellung des OpuF ABC Transporters im Vergleich zum OpuC ABC Transporter.....	73
Abbildung 24: Phylogenetische Verbreitung von OpuF in der Gattung <i>Bacillus</i>	75
Abbildung 25: Phylogenetische Verbreitung von OpuF in der Ordnung Bacillales.	77
Abbildung 26: Organisation des fusionierten OpuFB Proteins.	79
Abbildung 27: <i>in-silico</i> Modell der Substratbindedomäne des Proteins OpuFB aus <i>B. infantis</i>	80
Abbildung 28: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums verschiedener ABC Transportsysteme.	82
Abbildung 29: Wachstumsanalyse der Mutante OpuF-T ²⁹⁶ D unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung der Substratspezifität.....	85
Abbildung 30: Wachstumsvorteil des Stammes CCB3 gegenüber LTB10 unter hyperosmotischen Bedingungen mit verschiedenen Glycin Betain Konzentrationen.....	86

Abbildung 31: Suppressor-Screen und Wachstumsanalyse drei isolierter Suppressor Mutanten.	88
Abbildung 32: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Charakterisierung von Suppressor Stämmen.	89
Abbildung 33: Detektion von OpuCC in verschiedenen <i>B. subtilis</i> Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion zur Untersuchung der Transportermenge in Suppressor Stämmen...	90
Abbildung 34: Monomer des <i>in-silico</i> Modells des Repressors GbsR aus <i>B. subtilis</i> mit Suppressor Mutationen.	92
Abbildung 35: Wachstumsanalyse der Suppressor Mutanten im Vergleich zum Vaterstamm.	94
Abbildung 36: Detektion von OpuCC in verschiedenen <i>B. subtilis</i> Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion zur Untersuchung der Transportermenge in Suppressor Stämmen...	95
Abbildung 37: EMSA mit der <i>gbsA</i> Promotor- sowie Binderegion und verschiedenen GbsR-Mutanten.	99
Abbildung 38: Genetische Kontrolle der <i>gbsA</i> -Expression in An- und Abwesenheit von Cholin unter Einfluss von GbsR-Suppressor Mutanten.	102
Abbildung 39: Schematische Darstellung und Hypothese über die osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.	103
Abbildung 40: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.	104
Abbildung 41: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.	105
Abbildung 42: Wachstumskurven verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme zur detaillierten Analyse der osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.	107
Abbildung 43: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von [methyl- ¹⁴ C]-Cholin [1- ¹⁴ C]-Glycin Betain und über OpuB oder OpuC zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten.	108
Abbildung 44: <i>in-silico</i> „Docking“ von Homocholin in die Substratbindetasche von OpuBC und OpuCC.	109
Abbildung 45: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.	111
Abbildung 46: Einfluss von Homocholin auf die <i>de-novo</i> Prolinbiosynthese.	112
Abbildung 47: Einfluss der Homocholin und Cholin Akkumulation auf die <i>de-novo</i> Prolinbiosynthese.	113
Abbildung 48: Qualitative Identifizierung von Homobetain und Homocholin mit Hilfe von ¹³ C-NMR Spektren.	115
Abbildung 49: Quantitative Identifizierung von Homobetain und Homocholin mit Hilfe von LC-ESI-MS.	116
Abbildung 50: Blau-Weiß Screening zur Identifizierung von einer Homocholin induzierbaren GbsR Mutante.	118
Abbildung 51: Monomer des <i>in-silico</i> Modells des Repressors GbsR aus <i>B. subtilis</i> mit markierter Mutation GbsR-T ⁸⁸ A.	118
Abbildung 52: Genetische Kontrolle der <i>gbsA</i> -Expression in An- und Abwesenheit von Cholin und Homocholin unter Einfluss von GbsR-Mutanten.	119
Abbildung 53: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von unterschiedlichen kompatiblen Soluten.	120
Abbildung 54: Sequenzvergleich der SBPs OpuBC und OpuCC aus <i>B. subtilis</i>	149
Abbildung 55: Chemische Struktur einiger kompatibler Solute.	149
Abbildung 56: Ungewollte Mutation im OpuCC SBP des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC.	150
Abbildung 57: Osmoprotektionsassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zum Beweis, dass die ungewollte Mutation OpuCC-M ²¹¹ I keine Auswirkung hat.	150

Abbildung 58: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme radioaktiv markierter kompatibler Solute über die Transportsysteme OpuB, OpuC, OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC.....	151
Abbildung 59: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuB::OpuBC* ABC Transporter.	152
Abbildung 60: Aminosäuresequenzvergleich aller gefundenen OpuBC-Typ und OpuCC-Typ SBPs in der Gattung <i>Bacillus</i>	153
Abbildung 61: Osmotische Protektion von <i>B. subtilis</i> Stämmen mit verschiedenen OpuB und OpuC Transportermutanten.	154
Abbildung 62: Detektion des fusionierten SBPs OpuFB mit Hilfe einer FLAG-Tag Fusion.	155
Abbildung 63: Aminosäuresequenzvergleich aller OpuFB-Typ Proteine der Gattung <i>Bacillus</i>	156
Abbildung 64: Wachstumskurven verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme zur detaillierten Analyse der Glycin Betain Aufnahme verschiedener OpuF ABC Transporter.....	157
Abbildung 65: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuC und über die OpuF ABC Transporter.....	158
Abbildung 66: Osmoprotektionyassay verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Charakterisierung von mutierten OpuF ABC Transportern.....	159
Abbildung 67: Architektur der Substratbindetaschen verschiedener SBPs.....	159
Abbildung 68: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuB::OpuBC in Anwesenheit verschiedener GbsR Mutationen ABC Transporter.	160
Abbildung 69: Wachstumskurven verschiedener <i>B. subtilis</i> Stämme zur detaillierten Analyse der osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.	161
Abbildung 70: Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den ABC Transporter OpuA.	161
Abbildung 71: Wachstumsvorteil des Stammes SBB2 gegenüber SBB1 unter hyperosmotischen Bedingungen mit verschiedenen Glycin Betain und Homobetain Konzentrationen. ...	162
Abbildung 72: Wachstum der Stämme JSB8 und JH642 bei moderater Salzkonzentration.	162
Abbildung 73: Der Einfluss von GbsR auf Wachstum und LacZ-Aktivität.....	163
Abbildung 74: Blau-Weiß Screening zur Identifizierung von einer Homocholin induzierbaren GbsR Mutante.	164

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LB-Medium.....	27
Tabelle 2: 5x Spizizen's Minimal Medium (5xSMM)	27
Tabelle 3: 100x Spurenelemente	28
Tabelle 4: Minimalmedium A (MMA).....	28
Tabelle 5: Antibiotika, kompatible Solute und andere Medienzusätze	28
Tabelle 6: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	29
Tabelle 7: Verwendete <i>Bacillus</i> -Stämme	29
Tabelle 8: Verwendete Plasmide	32
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide.....	33
Tabelle 10: Low-Salt-Medium (LS-Medium)	38
Tabelle 11: Zusammensetzung 15% iges SDS-Gel.....	43
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antikörper	44
Tabelle 13: Kinetische Parameter der hybriden ABC Transportsysteme OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC im Vergleich zu den Wildtyp ABC Transportern OpuB und OpuC	54
Tabelle 14: Kinetische Parameter der OpuB-D ⁷⁴ T Mutante.....	69
Tabelle 15: Kinetische Parameter der fusionierten OpuF ABC Transporter aus <i>B. megaterium</i> , <i>B.</i> <i>infantis</i> und <i>B. panaciterrae</i> im Vergleich zum ABC Transporter OpuC aus <i>B. subtilis</i> .	84
Tabelle 16: Kinetische Parameter der ABC Transporter OpuB und OpuB::OpuCC in verschiedenen <i>B.</i> <i>subtilis</i> Stämmen.....	96
Tabelle 17: Kinetische Parameter der ABC Transporter OpuB und OpuC für Cholin, Homocholin, Glycin Betain und Homobetain.	109
Tabelle 18: Kinetische Parameter der beiden ABC Transporter OpuB::OpuCC und OpuB::OpuCC*.	150
Tabelle 19: Berechnung des Volumens in der Bindetasche von OpuBC und OpuBC-D ⁷⁴ T.....	154

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Bindekassette (<i>ATP-binding cassette</i>)
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)
Cml ^R	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alii</i> (lateinisch)
Genta ^R	Gentamycin-Resistenz
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxy-Säure
Kan ^R , neo ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria Bertani
MBP	Maltosebindeprotein
MMA	Minimalmedium A
MSC	<i>multiple cloning site</i>
N	Stickstoff (<i>nitrogen</i>)
N-terminal	Amino-terminal
NBD	Nukleotid Bindedomäne (<i>nucleotide-binding domain</i>)
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
oNPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pNPG	para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid
RBS	Ribosomenbindestelle

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SBP	Substratbindepotein (<i>substrate-binding protein</i>)
Spc ^R	Spectinomycin-Resistenz
TAE	Tris-HCl/Acetate/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TMD	Transmembranomäne (<i>transmembrane domain</i>)
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
Zeo ^R	Zeocin-Resistenz

Aminosäuren Einbuchstabencode:

A	Alanin	Q	Glutamin	L	Leucin	S	Serin
R	Arginin	E	Glutaminsäure	K	Lysin	T	Threonin
N	Asparagin	G	Glycin	M	Methionin	W	Tryptophan
D	Asparaginsäure	H	Histidin	F	Phenylalanin	Y	Tyrosin
C	Cystein	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin

1. Zusammenfassung

In seinem natürlichen Habitat ist das Bodenbakterium *B. subtilis* zahlreichen Stressfaktoren ausgesetzt. Eine aktive Adaption an Stresssituationen, welche es der Zelle ermöglicht gezielt auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren, ist essentiell für das Überleben in einem solchen Lebensraum. Um sich vor einer zu hohen Osmolarität zu schützen, akkumuliert *B. subtilis* organische Osmolyte, sogenannte kompatible Solute. Glycin Betain ist eines der weit verbreitetsten und wichtigsten kompatible Solute. Dieses Substrat kann auch über die Enzyme GbsA und GbsB aus dem Vorläufer Cholin synthetisiert werden. Der Cholin-sensitive Repressor GbsR reguliert hierbei sowohl die Expression des *gbsAB* Operons als auch des *opuB* Operons. Der ABC Transporter OpuB gehört zu den fünf Osmolyt Aufnahmesystemen von *B. subtilis*. Dieser Importer ist hoch spezifisch und transportiert mit hoher Affinität nur Cholin. Der nah verwandte ABC Transporter OpuC, welcher strukturell sehr ähnlich zu OpuB ist, ist in der Lage eine große Vielzahl an unterschiedlichen kompatiblen Soluten in die Zelle zu transportieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Substratbindeproteine von OpuB und OpuC modular genutzt werden können. Hybride ABC Transporter, in denen die SBPs OpuBC und OpuCC ausgetauscht wurden, sind funktionell im Transport osmoprotektiver Substanzen. Die Substratspezifitäten der ursprünglichen Wildtyp ABC Transporter OpuB und OpuC wurden durch das Implantieren des jeweilig anderen SBPs ausgetauscht. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *B. subtilis in-vivo* ein einzelnes OpuCC SBP ohne weitere Komponenten, als Bindeprotein für den vollständigen OpuB Transporter nutzen kann. Die unterschiedliche Substratspezifität von OpuB und OpuC kommt durch strukturellen Begebenheiten in der Ligandenbindetasche der SBPs zu Stande. Ein Threonin im promiskuitiven OpuCC SBP und ein negativ geladenes Aspartat im OpuBC SBP determiniert das Substratspektrum des ganzen ABC Transporters. Bioinformatische Analysen zeigten, dass OpuCC-Typ SBPs immer ein Threonin und OpuBC-Typ SBPs immer ein Aspartat besitzen. Mit Hilfe dieser Ergebnisse und phylogenetischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass das spezifische OpuB System, als Anpassung an die Gegebenheiten im Boden, durch Genduplikation aus dem OpuC Transporter entstanden ist.

Im Zuge dieser bioinformatischen Analyse wurde ein neuer wichtiger ABC Transportertyp der Ordnung Bacillales gefunden. Dieser OpuF Importer besitzt ein hybrides SBP-TMD Protein. Drei fusionierte OpuF ABC Transporter aus der Gattung *Bacillus* konnten heterolog in *B. subtilis* charakterisiert werden. Physiologische sowie kinetische Untersuchungen bewiesen, dass es sich bei zwei der untersuchten Transporter um hoch affine Glycin Betain Aufnahmesysteme handelt.

Mit Hilfe eines genetischen Suppressor Screens konnte die Struktur/Funktions-Beziehung des Repressors der Glycin Betain Synthese GbsR näher untersucht werden. Durch eine Charakterisierung von verschiedenen Suppressor Mutanten konnte die Bedeutsamkeit einer flexiblen Linkerdomäne des Proteins herausgestellt werden. Nicht nur die Domäne, welche im direkten Kontakt mit der DNA steht, spielt eine essentielle Rolle bei der Repression von *opuB* und *gbsA*. Durch den flexiblen Linker des Proteins wird eine dynamische Konformationsänderung von GbsR ermöglicht und die DNA-Bindung ist von dieser Dynamik abhängig.

Schließlich wurde ein neues kompatibles Solut für *B. subtilis* gefunden. Das Cholin-Derivat Homocholin kann sowohl über den spezifischen OpuB und als auch über den OpuC importiert werden und wird dann über die promiskuitiven Dehydrogenasen GbsA und GbsB zu dem Osmolyt Homobetain oxidiert. Dieser Syntheseweg wird von GbsR reguliert, allerdings ist eine Bindung von Homocholin an GbsR natürlicherweise nicht möglich. Ein genetischer Screen identifizierte einen einzelnen Aminosäureaustausch, durch welchen es möglich war, eine *gbsAB* Induktion durch Homocholin durch die Bindung von GbsR zu erlangen. Demnach konnte der Mechanismus der osmoprotektiven Eigenschaft des Cholin-Derivats Homocholin molekular aufgeklärt werden.

2. Einleitung

Bakterien gehören zu den weit verbreitetsten Organismen auf der Erde. Sie sind in der Lage die unterschiedlichsten Lebensräume zu kolonisieren. Dies schaffen Bakterien allerdings nur, wenn sie sich an die schwankenden Umwelteinflüsse wie Nährstoffgehalt, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit und Osmolarität anpassen können [2, 3]. Rasche Anpassungsmechanismen sind also unabdingbar, um Bakterien das Leben in den verschiedensten ökologischen Nischen zu ermöglichen [4, 5]. Besonders Bodenbakterien sind starken Schwankungen der Osmolarität ausgesetzt. Bei Regenfällen sinkt durch den erhöhten Wassergehalt die Osmolarität der Umgebung, sodass die Zelle durch Wassereinstrom entlang des osmotischen Gradienten zu platzen droht [3, 6]. Wird der Boden durch Sonneneinstrahlung ausgetrocknet, so befindet sich das Bodenbakterium in einem hyperosmotischen Milieu. Das Wasser in der Zelle würde über die semipermeable Membran herausströmen und die Zelle würde dehydrieren [7, 8]. *B. subtilis* ist ein sehr gut charakterisierter Modelorganismus für Gram Positive Bakterien und hat sein natürliches Habitat in den oberen Bodenschichten, weshalb dieses Bakterium von besonderem Interesse in der Forschung der osmotischen Stressantwort von Bakterien ist [8, 9].

2.1 Anpassung von *B. subtilis* an osmotische Stressbedingungen

B. subtilis ist ein stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium, welches vorwiegend aerob wächst, aber auch bei Sauerstoffmangel anaerob wachsen kann [10, 11]. Neben der Fähigkeit bei Nährstofflimitation hitzeresistente Endosporen zu bilden [12], kann *B. subtilis* schnell auf physiologischen Stress reagieren [13]. Nach einer Überflutung des Bodens werden osmotisch aktive Substanzen im Lebensraum von *B. subtilis* ausgedünnt und der Zellinnendruck der Zelle, welcher für die Zellteilung, das Zellwachstum und die Stabilität der Zelle essentiell ist, würde durch den raschen Wassereinstrom enorm steigen [3]. Um durch den zu hohen Turgor das Platzen der Zelle zu verhindern, schleust *B. subtilis* im Cytoplasma gelöste Stoffe unselektiv über die mechanosensitiven Kanäle MscL und MscS heraus [14]. Für das Überleben in hochosmolaren Umgebungen, in denen osmotisch wirksame Substanzen in der Umgebung steigen, hat *B. subtilis* ebenfalls eine Strategie zur Anpassung gefunden. Da ein aktiver Transport von Wasser über die Cytoplasmamembran in Mikroorganismen nicht möglich ist [6], steuert *B. subtilis* und auch viele andere Mikroorganismen den Wasserfluss durch eine gezielte Veränderung des osmotischen Potentials innerhalb des Cytoplasmas. Als erste Stressantwort werden Kaliumionen über die spezifischen Kalium Importsysteme KtrAB und KtrCD akkumuliert [15]. Kaliumionen sind die am häufigsten vorkommenden Kationen im

Cytoplasma und dienen, als eine der wichtigsten intrazellulären Osmolyte, der Aufrechterhaltung des Turgors [2, 8, 9, 15, 16]. Die positive Nettoladung alkalisiert allerdings das Cytoplasma und essentielle Vorgänge wie die Proteinbiosynthese werden gestört [17]. Aus diesem Grund ist ein zweiter Schritt der osmotischen Anpassung notwendig, der Export von Kalium und im Gegenzug die Akkumulation von sogenannten kompatiblen Soluten [7, 8, 18-21].

2.1.1 Kompatible Solute

Kompatible Solute sind kleine, wasserlösliche, organische Moleküle, die bei einem physiologischen pH-Wert keine Nettoladung tragen [22]. Es gibt eine Vielzahl an kompatiblen Soluten in der Natur und sie ermöglichen Bakterien das Wachstum in verschiedenen Stresssituationen [7, 8]. Da sie als Zwitterion vorliegen, können sie in sehr hohen Mengen im Cytoplasma akkumuliert werden, ohne einen negativen Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel, die Proteinfaltung, die Membranintegrität oder die Zellteilung zu haben [17, 22-24]. Die kompatiblen Solute schützen Mikroorganismen nicht nur vor hoher Osmolarität, sie sind ebenfalls in der Lage die Zelle vor Hitze sowie Kälte zu schützen [25-27]. Durch Anlagerung der Substrate in einem gewissen Abstand um die Proteine, werden sie von der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen, und unterstützen dabei ihre korrekte Faltung („preferential exclusion“) [28, 29]. Aufgrund dieser proteinstabilisierenden Eigenschaften werden kompatible Solute auch „chemische Chaperone“ genannt [30]. Vertreter für kompatible Solute lassen sich in verschiedene Stoffklassen zuordnen: den Aminosäuren und Aminosäurederivaten (z.B. Glutamat, Prolin, Ectoin, Prolinbetain), den Zuckern (z.B. Trehalose), den Trimethylammonium-Verbindungen und deren Sulfonium-Analoga (z.B. Glycin Betain, Homobetain, Carnitin, DMSP) und den Sulfatestern (z.B. Cholin-*O*-Sulfat) [7, 8, 31]. Eines der weit verbreitetsten und effektivsten kompatiblen Solute ist jedoch Glycin Betain [32]. Man findet Glycin Betain als Osmoprotektivum nicht nur in Bakterien (z.B. *B. subtilis*), es kommt auch in Archaeen, Pflanzen und tierischen und menschlichen Zellen vor [20, 33, 34]. Es kann von *B. subtilis* zum einen über die Opu (osmoprotectant uptake) ABC Transporter OpuA, OpuC und OpuD (Abbildung 1) spezifisch aufgenommen werden oder aber über Cholin als Vorläufermolekül synthetisiert werden [9, 35-37]. Cholin ist ebenfalls eine Trimethylammonium-Verbindung welche in die Zelle aufgenommen werden kann, die aber selbst keine osmoprotektiven Eigenschaft besitzt und demnach muss eine Oxidation zu Glycin Betain erfolgen (Abbildung 2) [38].

2.1.2 Aufnahme von kompatiblen Soluten

Osmoprotektive kompatible Solute gelangen über abgestorbenes Pflanzenmaterial, Wurzel-
ausscheidungen oder durch den Abbau von mikrobiellen und tierischen Zellen in den Boden,
wo sie dann von anderen Mikroorganismen aufgenommen werden können [39]. *B. subtilis* kann
in einer hyperosmotischen Stressantwort eine Vielzahl dieser kompatiblen Solute über die
bereits gut charakterisierten hochaffinen Opu Transportsysteme OpuA, OpuB, OpuC, OpuD
und OpuE aufnehmen (Abbildung 1). Diese sind osmotisch induzierbar und gehören zu den
Familien der Primären- und Sekundären Transportern und besitzen sehr unterschiedliche
Substratspektren [7, 9, 35-37].

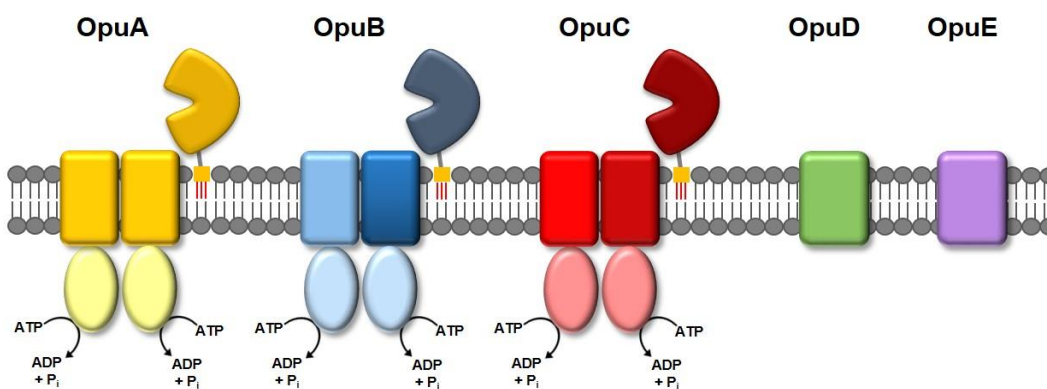


Abbildung 1: Die fünf Opu Transportsysteme aus *B. subtilis*.

Dargestellt sind die drei ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC und die Einzelkomponenten-
Transporter OpuD und OpuE. OpuA, OpuB und OpuC bestehen aus drei verschiedenen Komponenten:
den ATPasen (NBD), den Transmembrandomänen (TMD) und dem Substratbindepotein (SBP). In
OpuB und OpuC sind die TMDs Heterodimere, während es sich bei OpuA um einen Homodimer
handelt. Die SBPs sind über eine Lipid-Modifikation in der Membran verankert.

Die beiden Einzelkomponentensysteme OpuD und OpuE gehören zur Familie der Sekundären
Transporter [40]. OpuE, welches zur Unterfamilie der SSS-Transporter („sodium/solute
symporter“) gehört, ist ein hoch spezifischer Prolin Transporter [41], während OpuD zur
Unterfamilie der Trimethylammonium Aufnahmesystemen gehört (BCCT, „betaine-choline-
carnitine transporter“) und neben Dimethylglycin (DMG) und Dimethylsulfonyacetat (DMSA)
hauptsächlich Glycin Betain transportiert [36]. OpuA, OpuB und OpuC sind ABC Transporter
(„ATP-binding cassette“) und bestehen aus mehreren Komponenten [8, 35, 36, 42]. Der Aufbau
von ABC Transportern und deren Transportmechanismus wird in 2.2 näher beschrieben. OpuA
transportiert kompatible Solute wie Glycin Betain, Prolinbetain, Homobetain, DMSP, DMG
und DMSA [25, 31, 35, 40, 43-45]. Allerdings ist das OpuC Transportsystem in der Lage
zusätzlich die Substrate Cholin, Carnitin, Cholin-O-Sulfat, Crotonobetain und γ -Butyrobetain

in die Zelle zu schleusen und besitzt demnach das größte Substratspektrum [9, 37, 44, 46]. Das Transportsystem OpuB ist wiederum ein spezifischer ABC Transporter für Cholin (hochaffin) und Carnitin (niederaffin) [37, 46, 47]. Die ABC Transporter OpuB und OpuC sind in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da sie zwar ein enorm unterschiedliches Substratspektrum aufweisen, aber sehr eng miteinander verwandt sind [37, 48]. Details der Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden in 2.2.2 näher beleuchtet. Neben der Aufnahme eines breiten Spektrums von kompatiblen Soluten bei *B. subtilis* können einige dieser Substanzen aber auch synthetisiert werden.

2.1.3 Prolinbiosynthese in *B. subtilis*

Die Aminosäure Prolin wird neben *B. subtilis* von vielen weiteren Mikroorganismen synthetisiert, da es nicht nur als osmotische Schutzsubstanz dient, sondern auch essentiell für den anabolen Stoffwechsel ist [49]. Es kann ganz gezielt zwischen dem Bedarf als proteinogene Aminosäure und als Osmoprotektivum unterschieden werden. *B. subtilis* synthetisiert in einem anabolen Weg Prolin ausgehend von Glutamat mit Hilfe der Enzyme ProB, ProA und ProI [49, 50]. Im ersten Schritt wird Glutamat durch die Glutamyl-Kinase ProB phosphoryliert. Es folgt eine Reduktion des entstandenen γ -Glutamyl-11-Phosphats zu Glutamat-5-Semialdehyd über die γ -Glutamyl-Phosphatreduktase (ProA). Anschließend wird durch die Reduktase ProI Prolin synthetisiert. Die Gene des zweiten Prolinbiosyntheseweges werden osmotisch induziert. Hierbei sind die Enzyme ProH, ProJ und ProA beteiligt [51, 52]. Der Vorläufer und die Zwischenprodukte sind bei beiden Prolinbiosynthesewegen identisch. Durch die osmoadaptive Prolinbiosynthese kann *B. subtilis* bei einer Salzkonzentration von 1.2 M NaCl, bei der gerade noch Wachstum möglich ist, einen intrazellulären Prolinpool von 500 mM aufbauen [51]. Ob eine kontinuierlich hohe Salzkonzentration oder ein plötzlicher Anstieg der externen Osmolarität vorliegt ist bei der Induktion des *proHJ* Operons unerheblich. Im Vergleich mit anderen osmotisch induzierten Genen in *B. subtilis* besitzt das *proHJ*-Operon den stärksten Induktionsfaktor. Die Deletion des *proHJ* Operons führt zu einem osmosensitiven Wachstumsphänotyp [51, 52], was zeigt, dass die osmoadaptive Prolinbiosynthese bei der Anpassung von *B. subtilis* an hohe Osmolaritäten eine essentielle Rolle spielt.

2.1.4 Endogene Synthese von Glycin Betain in *B. subtilis*: die Rolle des MarR-Typ Regulators GbsR

Auch das kompatible Solut Glycin Betain kann in *B. subtilis* synthetisiert werden [38, 53-55]. Hierfür ist allerdings die Aufnahme des Vorläufermoleküls Cholin über die Opu Transporter OpuB oder OpuC nötig [37, 46]. Halophile Archaea, Schwefelbakterien und manche

Cyanobakterien sind in der Lage Glycin über drei Methylierungsschritten zu Glycin Betain umzuwandeln. Daran beteiligt sind die Glycin-Sarkosin-Methyltransferase und die Sarkosin-Dimethylglycin-Methyl-transferase. In diesem Prozess entstehen die Intermediate Monomethylglycin (Sarkosin) und Dimethylglycin (DMG) [56-58]. In *B. subtilis* allerdings wird Cholin in zwei Oxidationsschritten über das Intermediat Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain oxidiert (Abbildung 2) [54, 55]. Zur Oxidation von Cholin zur osmotischen Schutzsubstanzen Glycin Betain bedient sich *B. subtilis* der Enzyme GbsA und GbsB [54]. Bei GbsB handelt es sich um eine lösliche NAD-abhängige Alkohol Dehydrogenase vom Typ III. Diese oxidiert Cholin zu dem Intermediat Glycin Betain Aldehyd, welches selbst toxisch ist. Anschließend erfolgt ein weiterer Oxidationsschritt durch die salztolerante Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase GbsA, sodass als Endprodukt die osmotische Schutzsubstanzen Glycin Betain entsteht [55]. Die Gene, die für die Dehydrogenasen GbsB und GbsA kodieren, sind im Genom von *B. subtilis* in einem Operon (*gbsAB*) organisiert. Direkt vor dem Operon liegt in entgegengesetzter Richtung das Gen *gbsR*, welches für einen Cholin-abhängigen Repressor kodiert [38, 54]. Das Ausschalten dieses Gens hat eine verstärkte Aufnahme durch den Cholin spezifischen Transporter OpuB und eine verstärkte Expression des *gbsAB* Operons zur Folge. Befindet sich in der Zelle kein Cholin, so bindet der Repressor GbsR im Bereich der intergenen Region von *gbsR* und *gbsA* stromabwärts der -35 und -10 Region des *gbsA* Promotors und verhindert so durch einen „Road Block“ Mechanismus, dass die RNA-Polymerase das *gbsAB* Operon transkribieren kann [38]. Die genaue Bindestelle des GbsR Repressors konnte in der Dissertation von S. Ronzheimer identifiziert werden [59]. Auch vor dem *opuB* Operon befindet sich eine Bindestelle für den Repressor, sodass auch diese Expression verhindert wird. Bisher konnten nur Vermutungen angestellt werden, wo genau GbsR vor *opuB* bindet. Bereits geringe Mengen von Cholin (25 μ M im Medium) reichen aus, um den Repressor durch spezifische Bindung und anschließender Konformationsänderung von der DNA zu lösen [38]. Auch das für die Zelle schädliche und in der Natur selten vorkommende Intermediat Glycin Betain Aldehyd dient als Induktor des *gbsAB* Operons. Die Bindung von Cholin an GbsR (K_d von $165 \pm 15 \mu$ M) bewirkt demnach eine verstärkte Aufnahme dieses Substrates über den OpuB ABC Transporter und zudem die Induktion des Glycin Betain Syntheseweges über die Enzyme GbsB und GbsA [38]. Im Gegensatz zum *gbsAB* Operon ist das *opuB* Operon zusätzlich osmotisch induziert [37]. Die Expression des *opuC* Operons ist nicht durch GbsR reguliert, obwohl dieses Transportsystem ebenfalls Cholin in die Zelle transportieren kann. Durch erhöhte Mengen des kompatiblen Solut Glycin Betain kann in Anwesenheit vom GbsR Induktor Cholin ein inhibitorischer Effekt des *gbsAB* Operons beobachtet werden [38]. Der Mechanismus dieses

negativen „Feedback Loops“ ist bisher nicht geklärt. Vorstellbar wäre, dass es eine kompetitive Inhibition der beiden Substrate in einer Bindetasche gibt, das Protein GbsR zwei verschiedene Bindestellen besitzt oder dass durch einen chemischen Chaperon Effekt durch Glycin Betain die Bindung von GbsR zur DNA gehindert wird [38].

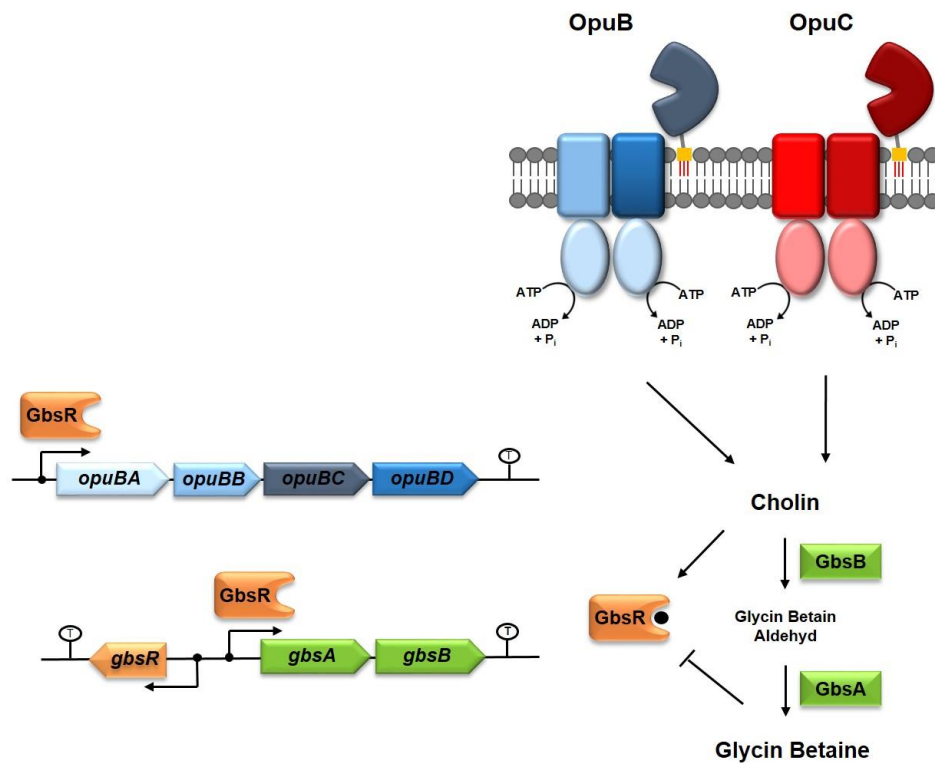


Abbildung 2: Regulation der Cholin Aufnahme über OpuB und der Glycin Betain Synthese.

Der Repressor GbsR (orange) reprimiert sowohl das *opuB* (blau) als auch das *gbsAB* (grün) Operon. Gelangt Cholin über die ABC Transportsysteme OpuB und OpuC in die Zelle, bindet es an den Regulator und durch eine Konformationsänderung des Proteins löst es sich von der DNA. Die Expression der Operone ist nun möglich. Modifiziert nach Nau-Wagner *et al.* (2012).

Das 21 kDa (180 AS) große Protein GbsR (glycine betaine synthesis regulator) gehört zur MarR-Familie von transkriptionellen Regulatoren (multiple antibiotic resistance regulator). Ein für MarR-Typ Regulatoren typisches Merkmal ist das Winged-Helix Motiv, mit welchem palindromische DNA Regionen gebunden werden können [60-62]. Nau-Wagner *et al.* konnten ein *in-silico* Modell des Repressors GbsR aus *B. subtilis* erstellen und eine solche Winged-Helix Struktur am N-Terminus des Proteins identifizieren (Abbildung 3B). Als Ausgangsstruktur diente der Regulator Mj223 (PDB: 1ku9) aus dem extrem thermophilen methanbildenden Archaeon *Methanococcus jannaschii* (Abbildung 3A) [63, 64]. Dieses Protein ist vermutlich an der Regulation von Antibiotika Resistenzgenen beteiligt und besitzt eine 34% ige Aminosäuresequenzidentität zum *gbsAB* und *opuB* Repressor GbsR. Bei der Kristallstruktur

von Mj223 handelt es sich um einen Homodimer, wobei die Monomere N-terminale Winged-Helix Motive aufweisen, mit der die DNA gebunden werden kann und dadurch eine transkriptionelle Regulation stattfinden kann [63, 65]. Vermutlich muss der Mj223 Homodimer eine starke Konformationsänderung vornehmen, sodass beide DNA Bindemotive die Basen binden können [63]. Die notwendige Bewegung ist vermutlich dank einer flexiblen Linkerregion möglich, welche zwischen einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne und des N-terminalen Winged-Helix Motivs liegt (Abbildung 3A). Eine putative Ligandenbindebox konnte in dem Regulator Mj223 nicht identifiziert werden. Wie bereits erwähnt konnte in der *in-silico* Struktur von GbsR aus *B. subtilis* ebenfalls eine Winged-Helix DNA Bindedomäne identifiziert werden (AS 49-73) [38]. Außerdem wurde in Nau-Wagner et al. vorhergesagt wo sich die C-terminale Dimerisierungsdomäne (AS 95-161) und der flexible Linker (AS 74-94) befinden. Anders als in der Ausgangsstruktur Mj223 konnte im Modell von GbsR eine mögliche Ligandenbindebox gefunden werden. Diese befindet sich in der Linkerregion zwischen Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne. Da GbsR ein Cholin-sensitiver Repressor für das *gbsAB* und *opuB* Operon ist, wurde nach einer typischen Ligandenbindetasche für Trimethylammoniumgruppen gesucht. Über aromatische Aminosäuren, welche eine Bindetasche formen, kann die positiv geladene Kopfgruppe, wie sie bei Cholin vorkommt, stabilisiert werden [38]. Der genaue Mechanismus einer derartigen Bindebox wird in 2.2.3 anhand weiterer Beispiele näher erläutert. Das *in-silico* Modell von GbsR weist eine derartige aromatische Bindebox auf. Sechs Phenylalanine (F⁹⁵, F⁹⁶, F⁹⁸, F⁹⁹, F¹⁰² und F¹⁰³) könnten diese aromatische Ligandenbindetasche für Cholin bilden. Im Protein Mj223 wurde keine derartige aromatische Box nicht gefunden werden. Eine Erstellung eines Homodimer Modells für GbsR aus *B. subtilis* zeigt eine sehr ähnliche Anordnung der Monomere wie auch für das Protein Mj223 [38, 63]. Die Dimerisierungsdomänen sowie die putativen Liganden-bindetaschen der beiden GbsR Monomere stehen zueinander und können interagieren (Abbildung 3C,D).

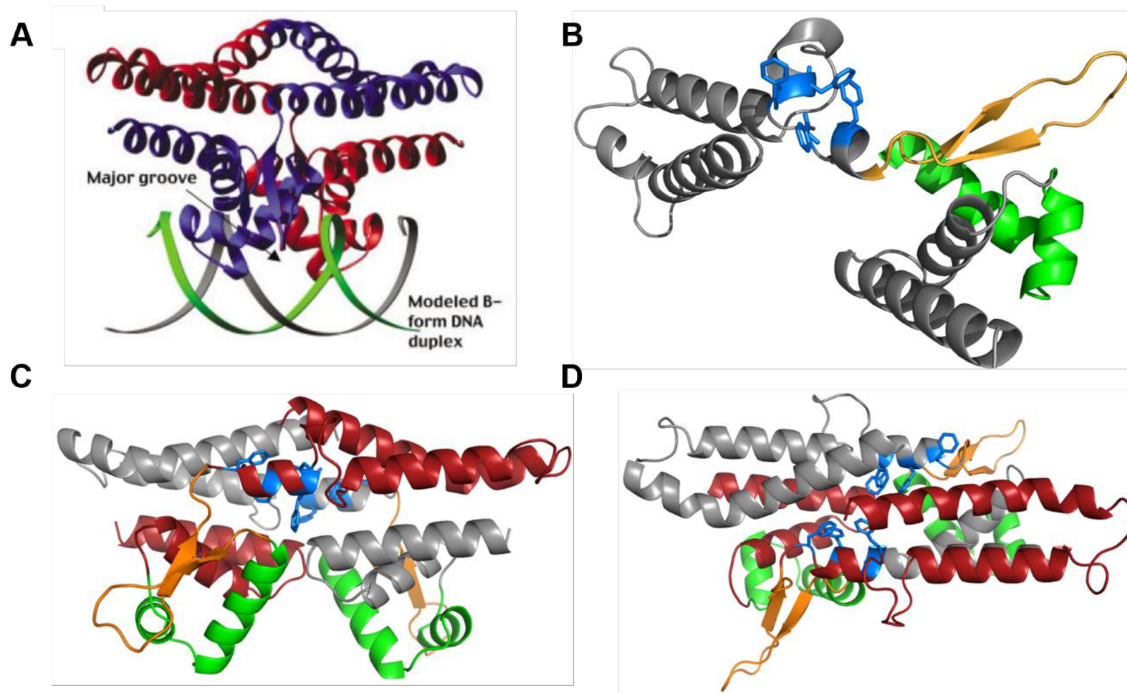


Abbildung 3: Struktur der DNA-Bindeproteine Mj223 aus *M. jannaschii* und GbsR aus *B. subtilis*.

(A) Der Homodimer des Proteins Mj223 aus *M. jannaschii* wurde auf DNA modelliert (Ray et al). Hierbei ist eine Konformationsänderung notwendig. (B) Das *in-silico* Modell von GbsR aus *B. subtilis* wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Mj223 (PDB: 1ku9) mit Hilfe des Webserver SWISS-Model erstellt [38]. Die vorhergesagte Bindetasche für Cholin, bestehend aus aromatischen Aminosäuren, ist in blau dargestellt. Das Winged Helix-Turn-Helix Motiv, welche die DNA-Bindung ermöglicht ist grün markiert. In orange wurde die bewegliche Linkerdomäne dargestellt. (C) und (D) zeigt ein *in-silico* Modeling eines GbsR Homodimers in zwei verschiedenen Ansichten.

2.2 Die ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *B. subtilis*

2.2.1 Aufbau und Mechanismus von ABC-Transportern

ABC Transporter sind in Prokaryoten sowie Eukaryoten weit verbreitet und bilden eine der größten Proteinfamilien [42, 66-71]. Sie können eine Vielzahl von Stoffen in die Zelle transportieren oder exkretieren [72, 73]. In Bakterien und Archaeen sind zum größten Teil Importer zu finden [69, 74, 75]. So vermitteln die ABC Transporter den Import von essentiellen Molekülen wie Nährstoffe, Signalmoleküle oder compatible Solute. In pathogenen Bakterien können ABC Transporter sogar als Virulenzfaktor dienen. Bei Eukaryoten dienen ABC Transporter überwiegend als Exporter. Besonders in der medizinischen Forschung von Krebstherapien spielen ABC Transporter als „Multi Drug Resistance“ Transporter eine große Rolle, da dieser Transportertyp in Krebszellen vorkommen kann und diese dadurch im Rahmen einer Chemotherapie eine erhöhte Toleranz gegenüber Zytostatika aufweisen können [76-79]. ABC Transporter können in vier Subgruppen klassifiziert werden (Abbildung 4), wobei drei

dieser Subgruppen [Typ I, Typ II und Typ III (ECF Transporter; energy coupling factor)] Importsysteme darstellen und ausschließlich in Prokaryoten vorkommen [67].

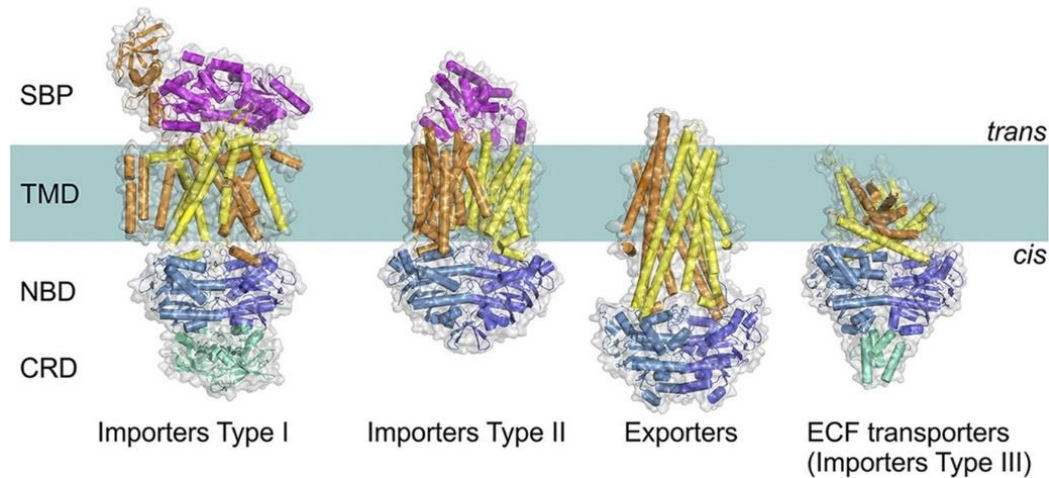


Abbildung 4: Übersicht der verschiedenen ABC Transportertypen.

Die ABC Transporterfamilie kann in vier Subgruppen unterteilt werden: den Exportern und drei verschiedenen Importern: Importer Typ I, Importer Typ II und ECF Transporter (Typ III). NBDs sind in blau, TMDs in gelb und orange und die extrazellulären SBPs sind in magenta gekennzeichnet. Zusätzliche intrazelluläre regulatorische Domänen (CRD) sind in grün dargestellt. Abbildung entnommen aus ter Beek *et al.* (2014) [67].

ABC Importer besitzen typischerweise zwei transmembrane Domänen (TMD) und zwei zytoplasmatische Nukleotid Bindedomänen (NBD), welche charakteristisch und namensgebend für die ABC Transporter sind [42, 67, 71, 73, 80, 81]. Die ATPase hydrolysiert ATP zwischen dem γ - und β -Phosphat in ADP und Phosphat und liefert damit die benötigte Energie für den Transportprozess diverser Moleküle (typischerweise -50 kJ mol^{-1} in Zellen) [67]. *In-vitro* Studien des OpuA Transporters aus *L. lactis* zeigten, dass pro Transport eines Glyzin Betain Moleküls zwei Moleküle ATP verbraucht werden [80]. Die Importsysteme der Subgruppe Typ I und Typ II besitzen zusätzlich ein Substratbindprotein (SBP) [42, 66, 69]. Dieses diffundiert in Gram Negativen Bakterien frei im Periplasma [82, 83] und ist in Gram Positiven Bakterien über einen Lipidanker an der Zellmembran befestigt [37, 84]. In Archaeen kann das SBP außerdem über eine hydrophobe Helix an die Membran gebunden sein (ModBC aus *A. fulgidus*) [85]. Zusätzlich gibt es SBP-abhängige ABC Transporter in Gram Positiven Bakterien, in denen das SBP an die TMD anfusioniert ist, um eine Befestigung der Substratbindedomäne an den ABC Transporter zu gewährleisten [86, 87]. In allen Fällen ist das extrazelluläre SBP für die Bindung des Substrates verantwortlich und liefert es an die TMDs weiter [66, 84, 85, 88, 89]. SBP-abhängige Importsysteme ermöglichen es der Zelle durch eine hoch affine Bindung auch in Umgebungen mit geringen Konzentrationen des jeweiligen Substrates dieses in die Zelle zu transportieren [66, 90, 91].

Die drei verschiedenen Typen von ABC Importern besitzen überlappende Substratspezifitäten, weshalb noch nicht ganz klar ist, wieso drei verschiedene Transportertypen während der Evolution entstanden sind [67]. Üblicherweise, allerdings nicht ausschließlich, sind Typ I ABC Transporter für den Import großer Substratmengen (z.B. Zucker, Aminosäuren) verantwortlich. Sie besitzen meist eine hohe Transportkapazität während sie Affinitäten im mittleren mikromolaren Bereich besitzen. Typ II ABC Transporter sind häufig dazu in der Lage sehr geringe Mengen eines Substrates (z.B. Ionen, Vitamine) wahrzunehmen und zu transportieren. Demnach besitzen viele dieser Importer eine sehr hohe Affinität (nanomolarer Bereich) zu den Liganden, während die Transportkapazität schlechter sein kann [67]. Das am besten untersuchte Typ I Transportsystem ist der Maltose Transporter von *E. coli* [92] [83, 93, 94] [95-97]. Er besteht aus zwei Kopien der ATPase MalK, aus den TMDs MalF und MalG und dem SBP MalE (oder MBP; maltose bindung protein). Interessanterweise besitzt MalK eine zusätzliche Bindestelle für Maltose, welche im Translokationskanal der beiden TMDs liegt. Eine zweite Bindestelle in den TMDs ist allerdings selten [83]. Während Typ I Importsysteme entweder identische (Homodimer) oder strukturell sehr ähnliche TMDs (Heterodimer) besitzen, so findet man in Typ II ABC Transportern stets identische TMDs, welche als Homodimer fungieren [67]. Ein sehr gut charakterisiertes Beispiel für einen Typ II Importer ist der Vitamin B₁₂ Transporter aus *E. coli*. Dieser besteht aus zwei identische Kopien der NBD (BtuD) und der TMD (BtuC) und einem SBP (BtuF) [85, 98-100].

Sowohl ABC Transporter des Typ I als auch des Typ II sind SBP-abhängig. Alle bisher beschriebenen SBPs bestehen aus zwei globalen Domänen (Abbildung 7A), welche über eine oder zwei flexible Linker oder über eine α -Helix, wie in BtuF aus *E. coli*, verbunden sind [66, 84, 101, 102]. Die beiden Domänen formen eine tiefe Spalte, in der sich die Substratbindetasche befindet (Abbildung 7A). In Abwesenheit des Substrates sind die Domänen sehr flexibel [84, 103, 104]. Wird allerdings ein Substrat gebunden, so schließen die Domänen den Liganden ein. Diese Konformationsänderung wird als „Venus Fly-trap“ bezeichnet (Abbildung 5) [42, 105]. Anschließend interagiert das geschlossene SBP mit den TMDs des ABC Transporters [85, 92, 94, 106, 107], wodurch es zu einer Konformationsänderung in den TMDs und den NBDs kommt. Die beiden NBDs liegen nun direkt nebeneinander, sodass ATP gebunden werden kann. Die ATP Bindung führt zu einem geöffneten Kanal zwischen den TMDs und das Substrat kann vom SBP entlassen und in den Translokationskanal geführt werden (Abbildung 5) [42, 66, 69, 71, 83, 89, 108, 109]. Im Falle von MalF kann Maltose spezifisch an die niederaffine Bindestelle in MalF binden [66, 71]. Schließlich führt die ATP Hydrolyse in den ATPasen des ABC Transporters und die folgende Entlassung von ADP und Phosphat zu einer erneuten

Konformationsänderung der TMDs. Diese sind nun nach außen geöffnet und das Substrat kann aus dem Translokationskanal entlassen werden (Abbildung 5) [42, 80, 81, 92, 94, 106, 107].

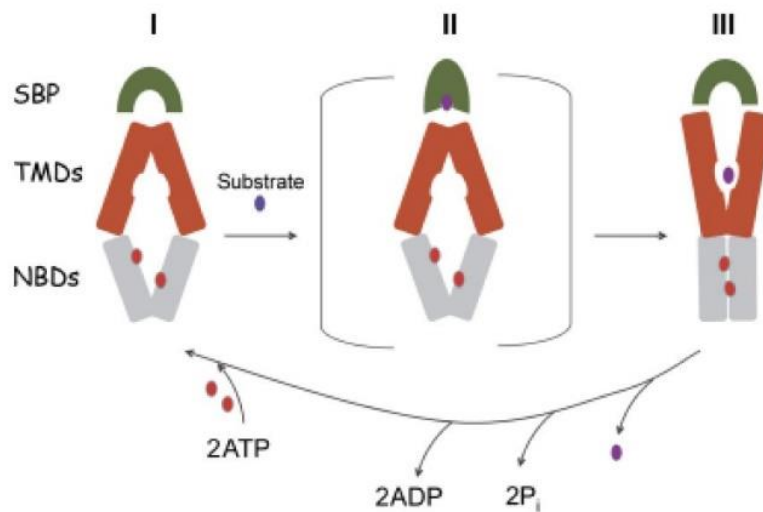


Abbildung 5: Schematische Übersicht über den Transportvorgang von Substraten in ABC Transportern.

Die zwei flexiblen Domänen des SBPs formen eine Ligandenbindetasche. Kommt es zur Bindung eines Liganden an das SBP (II), so klappen die beiden Domänen zusammen, sodass der Ligand fest gebunden ist. Das geschlossene SBP kann dann mit den TMDs des ABC Transporters interagieren, wodurch es zu einer Konformationsänderung in den TMDs und NBDs kommt (III). Die beiden NBDs liegen nun direkt nebeneinander, sodass ATP gebunden werden kann. Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Öffnung der TMDs, sodass das Substrat in das Zytosplasma entlassen werden kann [80, 81, 92, 94, 106, 107].

Einige der Typ I und Typ II ABC Transporter können mehr als nur ein Substrat transportieren. Es gibt SBPs, welche in der Lage sind mehrere meist ähnliche Substrate zu binden und deren Transport zu vermitteln. Ein Beispiel hierfür ist der Msm Transporter aus *Streptococcus mutants*, welcher mit nur einem SBP Melibiose, Sucrose, Raffinose, Isomaltotriose und Isomaltotetraose transportieren kann [110]. Das Peptid-SBP OppA aus *Lactococcus lactis* ist sogar in der Lage Peptide zu binden, welche zwischen 4 und 35 Aminosäuren lang sind [111]. Ein anderer Grund für das breite Substratspektrum eines ABC Transporters können mehrere unterschiedliche SBPs sein, die mit den gleichen TMD/NBD Komponenten interagieren, wie im His/Lys/Arg Transporter in *Salmonella typhimurium* [112].

2.2.2 Die Osmolyt Aufnahmesysteme OpuB und OpuC aus *B. subtilis*

In *B. subtilis* konnten 78 ABC Transportsysteme gefunden werden, von denen 38 SBP-abhängige Importer und 40 Exporter sind [113]. Drei dieser SBP-abhängigen Importsysteme spielen eine sehr wichtige Rolle in der osmotischen Stressantwort von *B. subtilis* (Abbildung 1). Die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC sind in der Lage kompatible Solute in die

Zelle zu schleusen und diese so vor der Hydratation in hyperosmotischen Umgebungen zu schützen [8, 9, 36]. Die beiden Aufnahmesysteme OpuB und OpuC fallen besonders auf, da sie eine hohe Homologie zueinander aufweisen, sich allerdings im Substratspektrum massiv unterscheiden. Die Aminosäuresequenzidentitäten der einzelnen Komponenten liegen bei 84% für die beiden NBDs (OpuBA/OpuCA), 85% für die beiden TMD Paare (OpuBB/OpuCB, OpuBD/OpuCD) und 71% für die maturen SBPs (OpuBC/OpuCC) [37]. Diese hohen Identitäten und die unmittelbare Lage ihrer Strukturgene (das *opuB* und das *opuC* Operon) im Genom von *B. subtilis* (nur durch 4.3 kbp getrennt), lassen vermuten, dass eines der beiden Operone aus dem anderen im Zuge einer Genduplikation entstanden ist. Trotz dieser Gemeinsamkeiten ist der OpuB Transporter ein sehr spezifisches System und besitzt eine sehr hohe Affinität zu Cholin [8, 9, 37, 46]. In dieser Arbeit konnte zusätzlich eine niedrige Affinität zu dem Trimethylammonium Substrat Carnitin (K_m 1.1 mM, Tabelle 13) gezeigt werden [46]. Durch die schlechte Affinität zu Carnitin wird im Folgenden vom hochspezifischem Cholin ABC Transporter gesprochen. Im Gegensatz zu dieser hohen Spezifität besitzt das OpuC System ein sehr breites Substratspektrum. Der promiskuitive OpuC Importer kann eine Reihe natürlich vorkommender kompatibler Solute wie z.B. Glycin Betain, Cholin, Carnitin oder DMSP transportieren aber auch der Import einiger synthetische DMSP Derivate konnte bereits gezeigt werden [8, 9, 37]. Sogar ein synthetisches Glycin-Betain Derivat, welches eine toxische Wirkung auf *B. subtilis* hat, kann über den OpuC ABC Transporter in die Zelle transportiert werden [114]. Insgesamt wurden bisher 16 kompatible Solute gefunden, welche zum Substratspektrum des OpuC Transporters gehören (Abbildung 6) [9]. Besonders die Tatsache, dass der multifunktionelle OpuC Importer ebenfalls Cholin und Carnitin in die Zelle transportieren kann, welche ebenfalls Substrate für den hochspezifischen OpuB Transporter sind, lässt vermuten, dass im Laufe der Evolution eine Genduplikation stattgefunden hat. Die Frage bleibt allerdings ungeklärt, welches ABC Transportsystem früher vorkam.

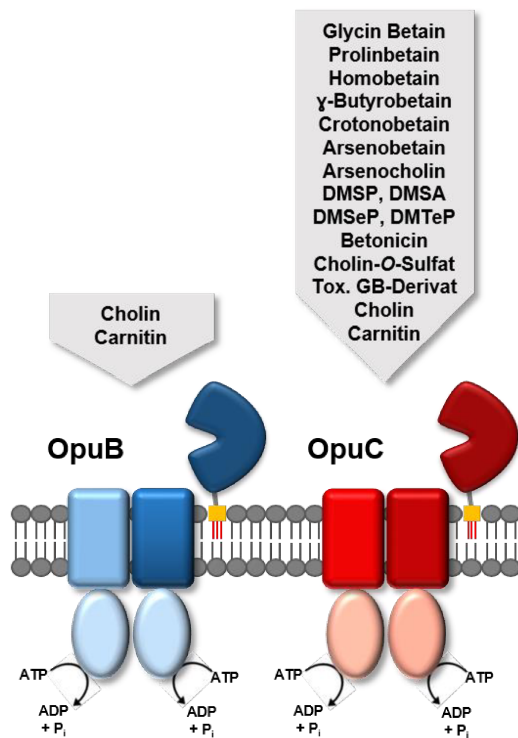


Abbildung 6: Substratspezifitäten der ABC Transporter OpuB und OpuC.

Schematische Darstellung des Aufbaus der ABC Transporter OpuB (blau) und OpuC (rot) aus *B. subtilis*. Die unterschiedlichen Substratspektren der Transporter sind dargestellt [9].

Neben dem großen Unterschied im Substratspektrum von OpuB und OpuC, gibt es Unterschiede in der Regulation der beiden Operone. Während *opuB* und *opuC* beide osmotisch induzierbar sind, ist nur das *opuB* Operon zusätzlich über den Repressor GbsR reguliert, welcher ebenfalls das *gbsAB* Operon reprimiert (2.1.4) (Abbildung 2) [38].

2.2.3 Die aromatische Substratbindetasche – Ein Merkmal von SBPs

Die Substratspezifitäten der beiden ABC Transporter OpuB und OpuC sind trotz der nahen Verwandtschaft sehr unterschiedlich. Es stellt sich die Frage, wie die SBPs OpuBC und OpuCC ihre Substrate binden und ob es in den Bindetaschen Gemeinsamkeiten und Unterschiede gibt. Die Kristallstrukturen der beiden Proteine sind bereits gelöst. Pittelkow *et al.* konnten OpuBC mit dem natürlichen Liganden Cholin kristallisieren und aufklären wie das Substrat in der Substratbindetasche stabilisiert wird. Auch die Bindung von verschiedenen Liganden im SBP OpuCC konnte von Du *et al.* aufgeklärt werden (Abbildung 7) [115, 116].

In beiden Systemen spielen aromatische Aminosäuren, die den Kern der Substratbindetasche bilden, eine essentielle Rolle. Positiv geladene Reste von Liganden, wie sie z.B. in Form der Trimethylammonium Kopfgruppe von Glycin Betain oder Cholin vorhanden sind, können mit

Oberflächen von aromatischen Strukturen, wie z. B. den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, interagieren. Über Kation- π -Interaktionen tritt die positive Ladung in Wechselwirkung mit dem elektronegativen Oberflächenpotential der Aromaten [117, 118]. Die Stärke der Kationen- π -Interaktion unterscheidet sich je nach elektrostatischem Potenzial der aromatischen Aminosäure. Das stärkste Potenzial besitzt das Tryptophan, worauf dann das Tyrosin und letztlich das Phenylalanin folgt [119]. Diese nicht-kovalente Bindung spielt bei Wechselwirkungen in biologischen Makromolekülen eine wichtige Rolle. Aromatische Systeme sind bei Enzymen, die Histone methylieren oder demethylieren [120], bei Interaktionen peripherer Membranproteine mit Phospholipidgruppen [121], bei Neurotransmittern wie Acetylcholin im Nervensystem [122], sowie bei SBPs von ABC Transportern bekannt [84].

Das SBP OpuBC aus *B. subtilis* besitzt ebenfalls einen „aromatischen Cage“, welcher aus vier Tyrosinen gebildet wird (T⁷¹, T¹¹⁷, T¹⁹⁷ und T²²¹) (Abbildung 7) [116]. Die positive Ladung der Trimethylammoniumgruppe des Liganden Cholin kann also über Kationen- π Interaktionen gebunden werden. Die Aminosäure D¹⁴⁹ (Aspartat) kann die Kopfgruppe von Cholin und die Aminosäure Q¹⁹ (Glutaminsäure) die Hydroxylgruppe stabilisieren. Die negativ geladene Aminosäure D⁷⁴ (Aspartat) kann ebenfalls eine Bindung mit der Hydroxygruppe eingehen. Neben der Interaktion von Cholin mit Aminosäuren findet eine Stabilisierung über Wassermoleküle zwischen Aminosäuren der Domäne I (grau) und Domäne II (gelb) statt (Abbildung 7B) [116]. Du *et al.* konnten zeigen, dass das SBP OpuCC aus *B. subtilis* den gleichen „aromatischen Cage“ besitzt wie sein Homolog OpuBC (T⁷¹, T¹¹⁷, T¹⁹⁷ und T²²¹). Die Liganden, unter anderem Glycin Betain, können ebenfalls durch Kationen- π Interaktionen gebunden werden. Wie Cholin in OpuBC wird auch Glycin Betain in OpuCC über Q¹⁹ durch direkte Interaktion stabilisiert. In OpuCC befindet sich an der Position 74 allerdings kein Aspartat wie in OpuBC, sondern ein Threonin. Das T⁷⁴ liegt aber ebenfalls in unmittelbarer Nähe der Carboxylgruppe von Glycin Betain, sodass auch hier eine Interaktion zur Stabilisierung vorliegt. Du *et al.* konnten bereits zeigen, dass ein Aminosäureaustausch in OpuCC von D⁷⁴T *in-vitro* zu einem Verlust der Glycin Betain Bindung führt [115]. Einzig die Aminosäure an Position 74 des reifen SBPs unterscheidet sich in der Substratbindetasche von OpuBC und OpuCC.

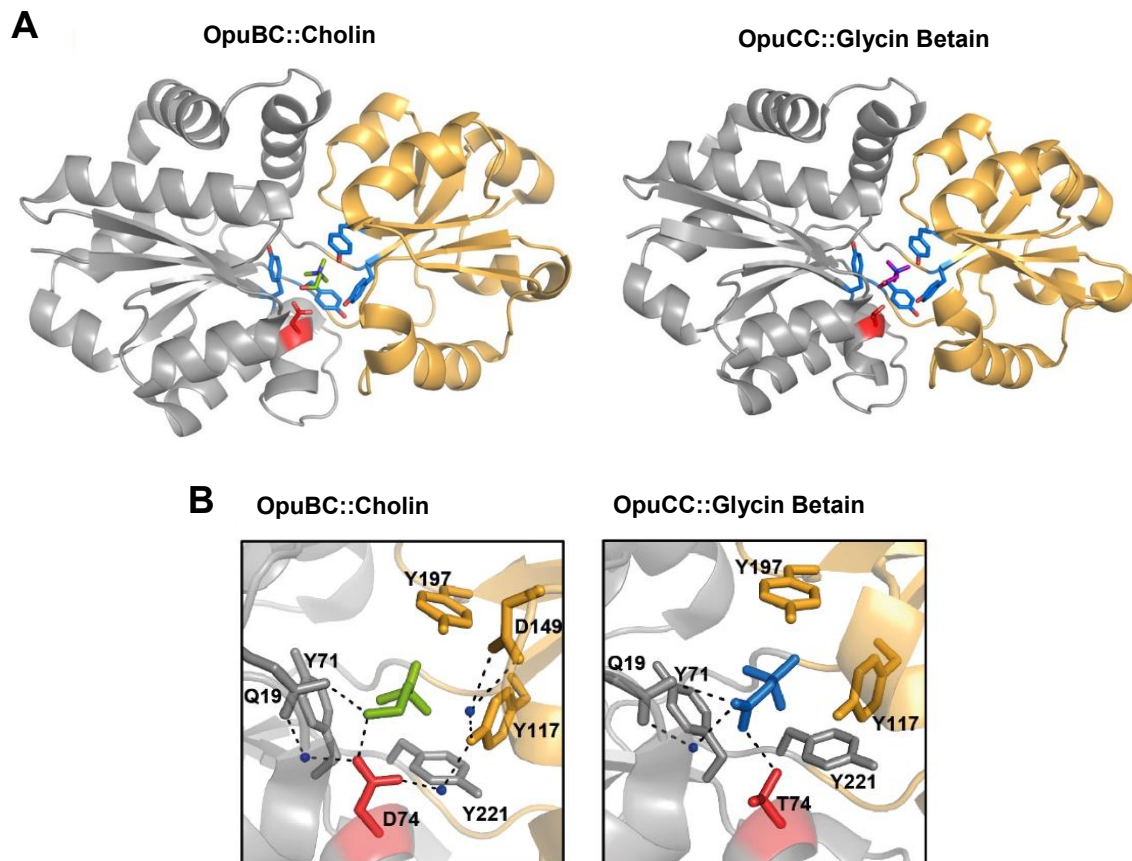


Abbildung 7: Die Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC der ABC Transporter OpuB und OpuC aus *B. subtilis*.

(A) Das SBP OpuBC ist im Komplex mit Cholin (grün, PDB: 3R6U) [116] und das Protein OpuCC mit Glycin Betain (magenta, PDB: 3PPP) [115] dargestellt. Die zwei globalen Domänen, welche typisch für SBPs sind, sind grau und gelb dargestellt. Diese Domänen formen eine tiefe Spalte, in der sich die Substratbindetasche befindet. Diese besteht aus vier Tyrosinen, welche eine aromatische Bindebox bilden (blau). Rot markiert wurde die Aminosäure (Position 74), welche eine essentielle Rolle bei der Bindung von Liganden spielt. (B) Die Architektur der Substratbindetasche ist im Detail zu sehen. Die aromatischen Aminosäuren sind hierbei in der Farbe markiert (gelb oder grau), von welcher Domäne sie abstammen. Weitere Aminosäuren, die an der Bindung der Liganden beteiligt sind, wie auch das Aspartat im OpuBC SBP (D^{74}) und das Threonin im OpuCC SBP (T^{74}), sind ebenfalls aufgestellt. Gestrichelte Linien kennzeichnen Wasserstoffbrückenbindungen. Blaue Punkte stellen Wassermoleküle dar.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden nah verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von kompatiblen Soluten, die *B. subtilis* nutzt, um sich vor osmotischen Stresssituationen zu schützen [9, 37]. OpuB und OpuC unterscheiden sich trotz ihrer hohen Sequenzidentität drastisch in ihrer Substratspezifität und in ihrer Regulation. Die SBPs der beiden Transportsysteme konnten bereits kristallisiert werden und bieten eine gute Grundlage für eine detaillierte Analyse der Substratspezifität der beiden ABC Transporter [115, 116]. In dieser Arbeit soll analysiert werden, welche Determinante dazu führt, dass zwei strukturell sehr ähnliche ABC Transporter verschiedene Substratspektren besitzen. Eine detaillierte Untersuchung der Substratbindetaschen von OpuBC und OpuCC soll hierbei Aufschlüsse geben. Da die Gene der beiden Transportsysteme im Genom von *B. subtilis* in direkter Nachbarschaft liegen, ist die Evolution einer der beiden Systeme durch eine Genduplikation naheliegend. Eine Analyse der phylogenetischen Verteilung von OpuB und OpuC soll aufklären, welcher der beiden ABC Transporter aus welchem etabliert wurde.

Auch auf die unterschiedliche Regulation der beiden ABC Transporter soll in dieser Arbeit eingegangen werden. Hierbei steht der *opuB* Regulator GbsR im Fokus. Der Cholin-sensitive Repressor GbsR reguliert neben dem *opuB* Operon zusätzlich die Gene der Glycin Betain Synthese (GbsA, GbsB), nicht aber das *opuC* Operon [38]. Es konnte bereits ein genetischer Screen entwickelt werden, durch den eine Charakterisierung der verschiedenen Domänen des Repressors GbsR ermöglicht wurde [48]. Mit Hilfe dieses Screens soll der Zusammenhang zwischen der Proteindynamik und der Funktionalität des Regulators aufgeklärt werden.

Es soll außerdem untersucht werden, ob das synthetische Cholin-Derivat Homocholin über einen der Opu ABC Transporter in die Zelle von *B. subtilis* transportiert werden kann. Weiterhin soll der Mechanismus des osmotischen Schutzes dieses Substrates aufgeklärt werden.

3. Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (Steinheim, DE), Merck (Darmstadt, DE) und Carl Roth (Karlsruhe, DE) bezogen. Restriktionsenzyme, Ligasen, Phosphatasen sowie dNTP's und Größenstandards stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE). Strep-Tactin Sepharose Säulenmaterial, sowie AHT und Desthiobiotin wurden von der Firma IBA GmbH (Göttingen, DE) bezogen.

3.1.2 Medien

B. subtilis und *E. coli* Stämme wurden routinemäßig unter aeroben Bedingungen bei 37 °C in LB-Medium (Luria-Bertani Broth) kultiviert (Miller 1992). Als Minimalmedium für *B. subtilis* diente das definierte Spizizen's Minimalmedium (SMM) [124]. Dem Medium wurden zusätzlich Spurenelemente und zur Komplementation des Stammes JH642 die Aminosäuren L-Tryptophan (20 mg/L) und L-Phenylalanin (18 mg/L) zugefügt. Als Kohlenstoffquelle diente 0.5% Glucose. Die Osmolarität des SMM wurde mit der Zugabe einer 5 M NaCl Stocklösung auf die gewünschte Osmolarität erhöht. *E. coli* Stämme wurden für heterologe Proteinexpressionen in modifiziertem Minimalmedium A (MMA) mit 0.5% Glucose, 0.2% Casaminosäuren, 1 mM MgSO₄ und 1 mg/L Thiamin kultiviert [125]. Zur Herstellung von Festmedien wurde den aufgeführten Grundmedien 15 g/L Agar zugesetzt.

Tabelle 1: LB-Medium

Komponenten	Zusammensetzung (1L)
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Tabelle 2: 5x Spizizen's Minimal Medium (5xSMM)

Komponenten	Zusammensetzung (475 ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
K ₂ HPO ₄	35 g
KH ₂ PO ₄	15 g
Na ₃ Citrat x 2H ₂ O	2.5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.5 g

Tabelle 3: 100x Spurenelemente

Komponenten	Zusammensetzung (1L)
CaCl ₂	0.55 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1.35 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0.1 g
ZnCl ₂	0.17 g
CuCl ₂ x 6H ₂ O	0.05 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.06 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.06 g

Tabelle 4: Minimalmedium A (MMA)

Komponenten	Zusammensetzung (1L)
K ₂ HPO ₄	10.5 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Na ₃ Citrat x 2H ₂ O	0.5 g

3.1.3 Medienzusätze

Antibiotika und die Zusätze Anhydrotetracyclin (AHT), 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) und Thiamin wurden als konzentrierte Stammlösung angesetzt und steril filtriert. Nach Abkühlung der Medien wurden die Zusätze in entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

Tabelle 5: Antibiotika, kompatible Solute und andere Medienzusätze

Komponenten	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	5 µg/ml (in 70% EtOH)
Erythromycin	1 µg/ml (in 70% EtOH)
Lincomycin	35 µg/ml
Gentamycin	20 µg/ml
Kanamycin (für <i>E. coli</i>)	50 µg/ml
Kanamycin (für <i>B. subtilis</i>)	5 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml (in 70% EtOH)
Zeocin	35 µg/ml
AHT	0.2 µg/ml (in DMF)
X-Gal	25 µg/ml (in DMF)
Thiamin	1 µg/ml

3.1.4 Kompatible Solute

Die kompatiblen Solute Glycin Betain, Cholin, Carnitin, Prolin und γ-Butyrobetain wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) bezogen. Prolin Betain und Betonicin wurden von Extrasynthese (Genay, FR) bezogen. Crotonobetain wurde freundlicherweise von Dr. J. Brass

(Lonza AG, Visp, CH), Homobetain von Dr. G. Nau-Wagner (Uni-Marburg, DE) und DMSP sowie Homocholin von Dr. J. Dickshat (Universität Bonn, DE) zur Verfügung gestellt.

Radioaktiv markiertes [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Glycin Betain (55 mCi/mmol) wurde von der Firma American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, USA) bezogen. Radioaktiv markiertes [$\text{methyl-}^{14}\text{C}$]-Cholin Chlorid (55 mCi/mmol) und [$N\text{-methyl-}^{14}\text{C}$]-Carnitin Hydrochlorid (57 mCi/mmol) stammen von der Firma Perkin-Elmer LAS GmbH (Rodgau, DE).

3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

3.2.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Präparation sämtlicher Plasmide wurde der der *E. coli* Stamm Top10 genutzt. Für die heterologe Proteinexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21 genutzt.

Tabelle 6: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	$F^{\lambda}\text{-}E44 \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{U169 } \Phi80\Delta\text{lacZ } \Delta\text{M15 } \text{hsdR17(r}_{\text{K-m}}\text{)} \text{recA1 } \text{endA } \text{thi-1 } \text{relA1 } \text{gyrA96}$	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
BL21	$F^- \text{ompT } \text{hsdS (r}_{\text{B}}^- \text{m}_{\text{B}}^-) \text{dcm}^+ \text{Tet}^r \text{gal } \text{endA}$	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Für alle in dieser Arbeit konstruierten *Bacillus* Stämme diente der Wildtyp Stamm JH642 als Ausgangsstamm.

Tabelle 7: Verwendete *Bacillus*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i> Stämme aus der Stammsammlung der AG Bremer		
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	[175]
BWB112	$\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \Delta(\text{proHJ}::\text{tet})$	B. Warmbold
CAB5	$\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo})$	C. Arnold
CAB6	$\Delta(\text{gbsAB}::\text{zeo})$	C. Arnold
CAB7	$\Delta(\text{gbsABR}::\text{zeo})$	C. Arnold
CCB2	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1 \text{amyE}::\text{opuB}$	[46]
CCB3	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1 \text{amyE}::\text{opuC}$	[46]
GNB48	$\Delta(\text{gbsR}::\text{neo})1 \Delta(\text{treA}::\text{erm})2 \text{amyE}::(\text{gbsA}'\text{-treA}, \Delta(\text{gbsR})2)1$	G. Nau-Wagner
GNB51	$\Delta(\text{treA}::\text{erm})2 \Delta(\text{gbsR}::\text{neo})1 \text{amyE}::(\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{gbsR})2$	G. Nau-Wagner
HKB8	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{amyE}::\text{opuF}_{\text{B.megaterium}}$	H. Kümmel
HKB9	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{amyE}::\text{opuF}_{\text{B.infantis}}$	H. Kümmel

HKB12	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ amyE}::\text{opuC}$	H. Kümmel
HKB13	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ amyE}::\text{pX-leer}$	H. Kümmel
HKB15	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ amyE}::\text{opuF}_{B.\text{panaciterrae}}$	H. Kümmel
HKB16	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ amyE}::\text{opuF}_{B.\text{infantis}}\text{-T}^{297}\text{D}$	H. Kümmel
HKB28	$\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ amyE}::\text{opuF}_{B.\text{infantis}}\text{-FLAG-Tag}$	H. Kümmel
HKB33	$\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ OpuCC}_{B.\text{subtilis}}\text{-FLAG-Tag am natürlichen Ort}$	H. Kümmel
HKB34	$\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}) \text{ OpuBC}_{B.\text{subtilis}}\text{-FLAG-Tag am natürlichen Ort}$	H. Kümmel
MAB1	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{gbsR}::\text{zeo}), \text{ amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}$	M. Aillaud
MAB2	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-F}^{99}\text{S}$	M. Aillaud
MAB3	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-R}^{85}\text{C}$	M. Aillaud
MAB4	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-G}^{83}\text{D}$	M. Aillaud
MAB5	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-D}^{50}\text{Y}$	M. Aillaud
MAB6	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-S}^{62}\text{N}$	M. Aillaud
MAB13	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-}$ Deltetion A (frame shift)	M. Aillaud
MAB15	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-15 bp}$ vor ATG	M. Aillaud
MAB17	$\Delta(\text{gbsR}::\text{kan})1 \Delta(\text{treA}::\text{ery})2 \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-K}^{77}\text{N}$	M. Aillaud
SBB1	$\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$	S. Broy
SBB2	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$	[46]
SBB5	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$	[46]
SBB6	$\text{amyE}::\text{pX-leer}$	S. Broy
SBB8	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuD}::\text{neo})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1 \text{ amyE}::\text{pX-leer}$	S. Broy
SBB10	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\text{amyE}::\text{opuC(T}^{74}\text{D)}$	S. Broy
STHB53	$\Delta(\text{treA}::\text{erm})1(\text{gbsR}::\text{spc})2 \text{ amyE}::\text{opuB}'\text{-treA}$	S. Ronzheimer
TMB118	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$	[46]

Während dieser Arbeit konstruierte *B. subtilis* Stämme:**Konstruktion^a**

LTB1	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}^*$	TMB118 + pChen5
LTB3	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}^*, \text{ GbsR-G}^{39}\text{E}$	Suppressor-Screen [46]
LTB4	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}^*, \text{ GbsR-T}^{79}\text{A}$	Suppressor-Screen [46]
LTB5	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}^*, \text{ GbsR-R}^{85}\text{S}$	Suppressor-Screen [46]
LTB10	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}::\text{CC}$	TMB118 + pLT1
LTB11	$\Delta(\text{gbsR}::\text{neo})1 \Delta(\text{treA}::\text{erm}) \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-G}^{39}\text{E}$	GNB40 + pLT2
LTB12	$\Delta(\text{gbsR}::\text{neo})1 \Delta(\text{treA}::\text{erm}) \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-T}^{79}\text{A}$	GNB40 + pLT3
LTB14	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuC}\Delta\text{CC}$	TMB118 + pChen11
LTB15	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{BC}$	TMB118 + pLT9
LTB16	$\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\text{amyE}::\text{opuC}\Delta\text{CC}::\text{BC}$	TMB118 + pChen6
LTB17	$\Delta(\text{gbsR}::\text{neo})1 \Delta(\text{treA}::\text{erm}) \text{ amyE}::\text{gbsA}'\text{-treA}, \text{ GbsR-R}^{85}\text{S}$	GNB40 + pLT4
LTB18	$\Delta(\text{treA}::\text{ery}) \Delta(\text{gbsR}::\text{spc}) \text{ amyE}::\text{opuB-treA}, \text{ ytol}::\text{gbsR}_{\text{wt}}$	STHB53 + pLT5

LTB19	$\Delta(treA::ery) \Delta(gbsR::spc) amyE::opuB-treA, ytoI::GbsR-G^{39}E$	STHB53 + pLT6
LTB20	$\Delta(treA::ery) \Delta(gbsR::spc) amyE::opuB-treA, ytoI::GbsR-T^{79}A$	STHB53 + pLT7
LTB21	$\Delta(treA::ery) \Delta(gbsR::spc) amyE::opuB-treA, ytoI::GbsR-R^{85}S$	STHB53 + pLT8
LTB22	$\Delta(treA::ery) \Delta(gbsR::spc) amyE::opuB-treA, ytoI::pBB287-leer$	STHB53 + pBB287
LTB23	$\Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1 \Delta(gbsR::zeo)$	SBB1 + cCAB5
LTB24	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1 \Delta(gbsR::zeo)$	SBB2 + cCAB5
LTB25	$\Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuB::ery)1 \Delta(gbsR::zeo)$	SBB3 + cCAB5
LTB26	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(gbsR::zeo)$	SBB5 + cCAB5
LTB27	$\Delta(opuC::spc)3 \Delta(gbsR::zeo)$	TMB108 + cCAB5
LTB28	$\Delta(opuB::ery)1 \Delta(gbsR::zeo)$	TMB116 + cCAB5
LTB29	$\Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuB::ery)3 \Delta(gbsR::zeo)$	TMB122 + cCAB5
LTB32	$\Delta(lacA::zeo)$	JH642 + cBIB36
LTB33	$\Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$	JBB8 + pLT11
LTB34	$\Delta(lacA::zeo) \Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$	LTB33 + cLTB33
LTB35	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1, ytoI::P_{spopuCC}$	SBB2 + pLT12
LTB36	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2, ytoI::P_{spopuCC}$	SBB5 + pLT12
LTB37	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuC\Delta CC, ytoI::P_{spank opuC}$	LTB14 + pLT12
LTB38	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC, ytoI::P_{spank opuC}$	LTB15 + pLT12
LTB47	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuB::ery)1 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2$ $\Delta(gbsR::zeo) amyE::opuB(D^{74}T)$	SBB9 + cCAB5
LTB48	$\Delta(gbsR::zeo) amyE::pX leer$	SBB6 + cCAB5
LTB50	$\Delta(opuA::tet)3 1 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(gbsR::zeo)$ $amyE::pX-leer$	LTB49 + cCAB5
LTB55	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-K^{77}N$	Suppressor-Screen
LTB56	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-F^{99}S$	Suppressor-Screen
LTB57	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-S^{62}N$	Suppressor-Screen
LTB58	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-Delta 253 bp$	Suppressor-Screen
LTB59	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-G^{83}D$	Suppressor-Screen
LTB60	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-D^{50}Y$	Suppressor-Screen
LTB61	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-R^{85}C$	Suppressor-Screen
LTB62	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-Deltetion A (frame shift)$	Suppressor-Screen
LTB63	$\Delta(opuA::tet)3 \Delta(opuC::spc)3 \Delta(opuD::kan)2 \Delta(opuB::ery)1$ $amyE::opuB\Delta BC::CC, GbsR-15 bp vor ATG$	Suppressor-Screen
LTB64	$\Delta(lacA::zeo) \Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$ + replizierendes Plasmid pLT39 ($gbsR^+$)	LTB34 + pLT39
LTB65	$\Delta(lacA::zeo) \Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$ + replizierendes Plasmid pGP380 (Leerplasmid)	LTB34 + pGP380

^aDas c vor dem Stammnamen bedeutet, dass die chromosomale DNA dieses Stammes zur Transformation genutzt wurde.

3.2.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 8: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGP380	Expressionsvektor für N-terminale Strep-Tag Fusionen in <i>B. subtilis</i>	J. Stülke
pChen5	<i>opuB</i> Operon mit nativem Promotor in dem <i>opuBC</i> durch <i>opuCC</i> ersetzt wurde: <i>opuBABC::CC</i>	[46]
pChen6	<i>opuC</i> Operon mit nativem Promotor in dem <i>opuCC</i> durch <i>opuBC</i> ersetzt wurde: <i>opuCACC::BC</i>	[46]
pChen11	<i>opuC</i> Operon mit nativem Promotor ohne <i>opuCC</i> : <i>opuCACC</i>	[46]
pGNB13	<i>amyE::gbsA'-treA, gbsR_{wt}</i>	G. Nau-Wagner
pGP380	Überexpressionsvektor (N-terminaler Strep-Tag) für <i>B. subtilis</i>	J. Stülke
pAC6	<i>amyE::lacZ</i>	J. Stülke
pBB286	Integrationsvektor <i>ytoI::zeo::ytoI</i>	D. Rudner
pBB287	Integrationsvektor <i>ytoI::tet::ytoI</i>	D. Rudner
pDR110	Espressionsvektor mit IPTG-induzierbarem P _{spank} Promotor	D. Rudner
pSTH02	pASK-IBA3 mit <i>gbsR</i>	S. Ronzheimer
pLT1 ^a	Mutagenese OpuCC-I ²¹¹ M auf pChen5 (OpuCC korrigiert)	diese Arbeit
pLT2 ^a	Mutagenese GbsR-G ³⁹ E auf pGNB13	diese Arbeit
pLT3 ^a	Mutagenese GbsR-T ⁷⁹ A auf pGNB13	diese Arbeit
pLT4 ^a	Mutagenese GbsR-R ⁸⁵ S auf pGNB13	diese Arbeit
pLT5	Klonierung <i>gbsR</i> (673 bp) in pBB287 (gbsR-F und gbsR-R)	diese Arbeit
pLT6 ^a	Mutagenese GbsR-G ³⁹ E auf pLT5	diese Arbeit
pLT7 ^a	Mutagenese GbsR-T ⁷⁹ A auf pLT5	diese Arbeit
pLT8 ^a	Mutagenese GbsR-R ⁸⁵ S auf pLT5	diese Arbeit
pLT9	Mutagenese OpuBA-Stop ²⁵⁴ Q auf pChen10 (OpuBA korrigiert)	diese Arbeit
pLT10	Klonierung Spankpromotor aus pDR110 in pBB286 (pHy-pBB284 p2 und pHy-pBB286)	diese Arbeit
pLT11	Klonierung <i>gbsA</i> Fragment (464 bp) in pAC6 (treA4-SmaI und treA5a-BamHI)	diese Arbeit
pLT12	Klonierung <i>opuCC</i> inkl. RBS in pLT10 (<i>opuCC</i> -pDR110-gibson-f und <i>opuCC</i> -pDR110-gibson-SphI-rev)	diese Arbeit
pLT20 ^a	Mutagenese GbsR-G ³⁹ E auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT21 ^a	Mutagenese GbsR-T ⁷⁹ A auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT22 ^a	Mutagenese GbsR-R ⁸⁵ S auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT23 ^a	Mutagenese GbsR-K ⁷⁷ N auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT24 ^a	Mutagenese GbsR-S ⁶² N auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT25 ^a	Mutagenese GbsR-G ⁸³ D auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT26 ^a	Mutagenese GbsR-F ⁹⁹ S auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT27 ^a	Mutagenese GbsR-D ⁵⁰ Y auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT28 ^a	Mutagenese GbsR-R ⁸⁵ C auf pSTH02	diese Arbeit ^b
pLT39	Klonierung <i>gbsR</i> inkl. Promotor in pGP380 (gbsR-pGP380-for und gbsR-pGP380-rev)	diese Arbeit

^aDie verwendeten Primer für die Mutagenesen sowie das veränderte Codon sind Tabelle 9 zu entnehmen.

^bDie Plasmide wurden im Rahmen eines durch mich betreuten Praktikums von Frederick Durham konstruiert.

3.2.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth (Lindau, DE) synthetisiert und sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Bemerkung
Sequenzierungsprimer:		
pBB286 seq rev	GGTATGCGTTTTGACACATCC	Sequenzierung pBB286-P _{spank}
ytoI-for	GGAATCACGTGGTCCTTGC	Sequenzierung <i>ytoI</i> -Integration
ytoI-rev	CCCGACCGGCTTCTTACAG	Sequenzierung <i>ytoI</i> -Integration
opuBCF	ATGAAAAGAAAATATCTCAAAT TAATGATAGGTTTAGCAC	Sequenzierung <i>opuBC</i>
opuBCR	TCACGATTTCGAAATAGCGATGTT TTTCTAAATATTCC	Sequenzierung <i>opuBC</i>
opuBF	CGGTTTCATCCTTTCAGCTAACA ATTC	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
opuBseq1	TTCAGCAGAATATCTCACTCGTC C	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
opuBseq2	AAACGCTTTCTGAGGCCATTACAG C	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
opuBseq3	GCGGCGGATTGGGTGATTACAT TT	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
opuBseq4	TGTGCTTGCGTATTCAACCGATG G	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
OpuBCCF	TGGATTTCCTTACGCGAAATACG GGCAG	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
OpuBCCR	CTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTA GTA	Sequenzierung <i>opuBΔBC::CC</i>
Klonierungsprimer:		
gbsR-F	AAAGCTAGCGTTTTTTAAACTGT CAAAGTCCC	Konstruktion pLT5
gbsR-R	AAAGCTAGCCTGCTTTACTTTGT TTCGACCG	Konstruktion pLT5
pHy-pBB286_P1	CATAACCTGAAGAATTGGATCC ATGCTAGCCCGTTATTATTATT TTTGACACCAGACCAACT	Konstruktion pLT10
pHy-pBB284_P2	GGCTTCTTACAGCGTTGATTTCG CCGATGATTAATTAATTCAGAAC GCTCG	Konstruktion pLT10
opuCC-pDR110-gibson-f	GGAATTGTGAGCGGATAACAAT TAAGCTTAAAGGAGTTGGCACT GTTGAAAATG	Konstruktion pLT12
opuCC-pDR110-gibson-SphI-rev	CACCGAATTAGCTTGCATGCTTA GTCAAATAATGATGTTTCTCTA AAAATTCC	Konstruktion pLT12
treA4-SmaI	CGAAACATGAGG	Konstruktion pLT11
treA5a-BamHI	GAAAAACATTGGC	Konstruktion pLT11
gbsR-pGP380-for	AAAGTCGACGTTTTTTAAACTGT CAAAGTCCC	Konstruktion pLT39
gbsR-pGP380-rev	AAAGGATCCCTGCTTTACTTTGT TTCGACCG	Konstruktion pLT39
Mutageneseprimer:		

Q5-K77N-for	TAGTGAAAAAcACATTTACCG	Mutagenese GbsR: K ⁷⁷ N (AAA→AAC)
Q5-K77N-rev	CATTTAAGTCTTGAAGCTTTTGT	Mutagenese GbsR: K ⁷⁷ N AAA→AAC
Q5-S62N-for	AGCAAACCAAcCATGAGCACT	Mutagenese GbsR: S ⁶² N (AGC→AAC)
Q5-S62N-rev	CATTTGCAACTCCTCACG	Mutagenese GbsR: S ⁶² N (AGC→AAC)
Q5-G83D-for	TTTACCCGGGaCATCCGCAAG	Mutagenese GbsR: G ⁸³ D (GGC→GAC)
Q5-G83D-rev	TGTTTTTTTCACTACATTTAAGTC TTGAAG	Mutagenese GbsR: G ⁸³ D (GGC→GAC)
Q5-F99S-for	TTTAAATTTTcACAAATTTCTTT CCAC	Mutagenese GbsR: F ⁹⁹ S (TTC→TCC)
Q5-F99S-rev	GAAATCCTTCTCAGCCAC	Mutagenese GbsR: F ⁹⁹ S (TTC→TCC)
Q5-D50Y-for	GATGACGCTTtACGAAATGCG	Mutagenese GbsR: D ⁵⁰ Y (GAC→TAC)
Q5-D50Y-rev	TCATCCCTCATATACATCG	Mutagenese GbsR: D ⁵⁰ Y (GAC→TAC)
Q5-R85C-for	CCGGGGCATCtGCAAGCATAc	Mutagenese GbsR: R ⁸⁵ C (CGC→TGC)
Q5-R85C-rev	TGAAATGTTTTTTTCACTACATT TAAGTCTTGAAGC	Mutagenese GbsR: R ⁸⁵ C (CGC→TGC)
Q5-15bp vor ATG-for	TTTTCTAAAGaAAAAGAGGGTCA G	Mutagenese GbsR: 15bp vor ATG
Q5-15bp vor ATG-rev	TTAAATTCGTTAAGTTATTTCTTT ATG	Mutagenese GbsR: 15bp vor ATG
Q5_GbsRMut1_GzuA_F	ATTTTATATGaGACGATGTATAT GAGGGATGAG	Mutagenese GbsR: G ³⁹ E (GGG → GAG)
Q5_GbsRMut1_GzuA_R	CCCGACACTGCGGGTAAT	Mutagenese GbsR: G ³⁹ E (GGG → GAG)
Q5_GbsRMut2_AzuG_F	AGTGAAAAAAgCATTTACCGG	Mutagenese GbsR: T ⁷⁹ A (ACA → GCA)
Q5_GbsRMut2_AzuG_R	ACATTTAAGTCTTGAAGCTTTTT G	Mutagenese GbsR: T ⁷⁹ A (ACA → GCA)
Q5_GbsRMut3_CzuA_F	CCGGGGCATCaGCAAGCATAc	Mutagenese GbsR: R ⁸⁵ S (CGC → AGC)
Q5_GbsRMut3_CzuA_R	TGAAATGTTTTTTTCACTACATT TAAGTCTTG	Mutagenese GbsR: R ⁸⁵ S CGC → AGC)

Primer für Electrophoretic mobility shift assay (EMSA):

BS_gbsA_for	GGGACTTTGACAGTTTAAAAACC	Forward Primer für <i>gbsA</i> Fragment
BS_gbsA_rev	ATAAGCCTCCTTGACGTAAATAA	Primer trägt am 5'-Ende eine Markierung (Dyomics 781)
BS_gbsA_kfrag_for	CTTGCTTGTTGAGGATGCCATTC	Forward Primer für Kontrollfragment in <i>gbsA</i>
BS_gbsA_kfrag_rev	CTGTCTCAGCATGAAAACCGTTT C	Primer trägt am 5'-Ende eine Markierung (Dyomics 781)

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Sterilisation

Hergestellte hitzestabile Kultivierungsmedien wurden für mindestens 60 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeinstabile Substanzen wurden steril filtriert (Sterilfilter mit 0.2 µm Porengröße). Verwendete Glaswaren wurden für mindestens 3 Stunden bei 180 °C sterilisiert.

3.3.2 Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden zunächst auf einer LB-Agarplatte im 37 °C Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Kultivierung erfolgte dann in 5 ml LB-Medium im Reagenzglas auf einem Roller bei 37 °C. Enthielt der Stamm ein Plasmid, wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Mit der *B. subtilis* LB-Vorkultur wurde eine 20 ml SMM-Vorkultur (in 100 ml Erlenmeyerkolben) angeimpft und schüttelnd (220 rpm) im Wasserbad bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 1 inkubiert. Die 20 ml SMM Hauptkultur mit verschiedenen Osmolaritäten wurde mit der SMM-Vorkultur auf eine OD₅₇₈ von 0.1 angeimpft und bis zur gewünschten OD₅₇₈ inkubiert.

Zur Stammhaltung wurde eine LB-ÜberNachtkultur mit Glycerin (Endkonzentration 20%) versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Ermittlung der Zelldichte

Die optische Dichte von Flüssigkulturen von *B. subtilis* und *E. coli* wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD₅₇₈) bestimmt (Amersham Bioscience, Ultrospec 3100 pro, Freiburg, DE). Als Referenz diente das Medium, in dem inokuliert wurde. Eine OD₅₇₈ von 1 entspricht hierbei einer Zelldichte von ca. 1×10^9 Zellen/ml [125].

3.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.4.1 Präparation, Aufarbeitung und Klonierungsverfahren von DNA

Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolierung der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* Stämmen erfolgte aus 5 ml LB Kulturen, die maximal 3 Stunden auf dem Roller bei 37 °C inkubiert wurden, um eine

Sporenbildung zu vermeiden. Die Präparation wurde nach der Vorschrift von Marmur (1961) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) aus 5-10 ml LB-ÜberNachtkultur mit dem jeweiligen Antibiotikum isoliert. Für größere Plasmid DNA Mengen erfolgte die Präparation aus bis zu 500 ml Kultur mit dem Plasmid Midi Kit von QIAGEN (Hilden, DE). Es wurde bei der Präparation nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers gearbeitet.

Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente (PCR-Produkte, Restriktionsverdau, DNA-Extrakte) wurden nach ihrer Größe mit Hilfe der Gelelektrophorese auf 1% Agarose in 1x TAE-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM Borsäure und 1 mM EDTA) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x TAE-Puffer verwendet. Die DNA Proben wurden zuvor mit einem 6 x Loading Dye versetzt. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb Plus von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) genutzt. Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Nach dem Auftrennungsprozess wurde das Agarosegel für 10 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gelegt. Die gefärbte DNA wurde nun mittels eines UV-Durchlichts bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht.

Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA

Die Amplifizierung verschiedener DNA-Fragmente aus der chromosomalen DNA erfolgte mittels PCR ("Polymerase Chain Reaction") nach dem Protokoll der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE). Die Reaktion wurde in 50 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Es wurden 10-50 ng Plasmid oder genomische DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Reinigung eines PCR Fragments

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten oder Plasmiden erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 30-50 µl H₂O aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die genaue DNA Konzentration wurde photometrisch am Nano-Drop[®] (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit den FastDigest Restriktionsenzymen der Firma Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE). Die eingesetzte Menge und die Reaktionszeit richteten sich nach den Herstellerangaben des verwendeten Enzyms. Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von geschnittenen Plasmiden erfolgte mit der Thermosensitiven-Alkalinen-Phosphatase von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE). Die Ligation eines geschnittenen DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor erfolgte ausschließlich mit der T4 DNA Ligase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Inkubationszeit richteten sich jeweils nach den Herstellerangaben.

Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma MWG Eurofins (Lindau, DE) nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Mit der DNA-Sequenzierung wurden Klonierungen und zielgerichtete Mutagenesen überprüft. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 zu finden. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes Ape- A Plasmid Editor v2.0.45 (M. Wayne Davis).

Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des Q5[®] Site Directed Mutagenesis Kit der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) mutiert. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem NEBase Changer des Herstellers erstellt. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.2 Transformation von Bakterien

Herstellung chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Bei der Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde nach dem Protokoll von Sambrook und Russel (2001) vorgegangen. Es wurden 200 ml LB-Kultur mit einer LB-ÜberNachtkultur auf eine OD₅₇₈ von 0.1 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0.4 bis 0.5 bei 37 °C auf dem Luftschüttler bei 200 rpm kultiviert. Die Zellen wurden dann 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4 °C bei 5.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in

eiskaltem 0.1 M CaCl₂ gewaschen und erneut in 4 ml 0.1 M CaCl₂ mit 15% Glycerin aufgenommen. Aliquots von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Aliquots der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ca. 250 ng Plasmid DNA bzw. 20 µl des Ligationsansatzes werden zugefügt. Der Transformationsansatz wurde für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C erfolgte. Daraufhin wurden die Zellen wieder 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 900 µl LB Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 37 °C und 500 rpm auf dem Thermoblock wurde der Transformationsansatz 3 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und schließlich das Pellet in ca. 100 µl des Überstandes aufgenommen und auf Selektivmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen

Bei der Transformation von *B. subtilis* mit DNA wurde dessen Eigenschaft der natürlichen Kompetenz bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase zu Nutze gemacht. Zunächst wurden 3 ml SMM mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und über Nacht auf dem Roller bei 37 °C inkubiert. 1 ml der ÜberNachtkultur diente am nächsten Tag zur Inokulation von 20 ml LS-Medium (Tabelle 10). Die Kultur wurde anschließend 3 Stunden bei 30 °C und 100 rpm im Wasserbad inkubiert. In einem 2 ml Eppendorf Gefäß wurden 3-5 µg Plasmid DNA oder 100 ng chromosomale DNA vorgelegt und mit 1 ml der *B. subtilis* Kultur gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 2 Stunden bei 37 °C auf dem Roller inkubiert, dann 3 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

Tabelle 10: Low-Salt-Medium (LS-Medium).

Komponenten	Zusammensetzung (20ml)
5xSMM (inkl. Spurenelemente)	2 ml
20% Glucose	200 µl
10% Hefeextrakt	200 µl
2% Casaminoäuren	100 µl
50 mM Spermin	200 µl
1 M MgCl ₂	50 µl
Trp (4 g/L)/ Phe (3,6 g/L) Stocklösung	50 µl

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Nachweis der Amylase-Aktivität

Um mutierte Gene oder Reportergenfusionen in das Genom von *B. subtilis* stabil zu integrieren können rekombinatorische Flanken des Gens *amyE*, die auf den jeweiligen Plasmiden liegen, genutzt werden. Hierbei erfolgt eine doppelt homologe Rekombination in das Gen *amyE* im *B. subtilis* Genom. Das funktionale *amyE* kann sehr einfach nachgewiesen werden, da die von ihm kodierte Amylase dem Bakterium erlaubt, Stärke abzubauen. Es ist außerdem für *B. subtilis* nicht essentiell. Da die Integrationsplasmide mit der 3'- und 5'-Flanke ebenfalls eine Chloramphenicolresistenzkassette besitzen, kann zunächst eine Selektion auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol erfolgen. Der Nachweis für die Integration in das Gen *amyE* kann dann auf Stärkeplatten erfolgen. Ist das Gen intakt wird extrazelluläre Amylase gebildet und die Stärke kann abgebaut werden. Wurde das Gen durch Rekombinationsereignisse zerstört, wird keine Amylase mehr gebildet und die Stärke wird nicht abgebaut. Wird nun eine Iod-Kaliumiodid-Lösung auf die Stärkeplatte mit den Zellen getropft, bildet sich ein deutlich sichtbarer Hof, wenn das Gen *amyE* noch intakt ist. War die Integration in *amyE* erfolgreich ist kein Hof erkennbar.

3.5.2 Bestimmung von Expressionslevel mit Hilfe von Reportergenfusionen

Um den Einfluss verschiedener *gbsR* Mutanten auf das Expressionslevel von *gbsA* und *opuB* zu bestimmen, wurden Reportergen Studien mit einer *gbsA-treA* Fusion und einer *opuB-treA* Fusion durchgeführt. Das hier verwendete Reporterenzym TreA kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glucosidase, die das Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid) in ein gelb gefärbtes Reaktionsprodukt umwandelt [126, 127]. *B. subtilis* Stämme, die eine *gbsA-treA* besitzen, wurden in 0 M NaCl SMM bis zu einer OD₅₇₈ von 0.25 kultiviert und 1.5 ml der Kultur für 15 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert. Die Proben stellen die uninduzierte Probe da. Den ursprünglichen Kulturen wurde nun NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.4 M und Cholin bzw. Homocholin bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Diese induzierten Kulturen wurden nach 90 Minuten wie oben beschrieben pelletiert. *B. subtilis* Stämme mit einer *opuB-treA* Fusion wurden kontinuierlich in 0 M NaCl (uninduziert) oder 0.4 M NaCl (induziert) bis zur einer OD₅₇₈ von 1 kultiviert und ebenfalls, wie oben beschrieben, pelletiert. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Probenverarbeitung und Messung der TreA-Aktivität wurde wie in Gotsche und Dahl (1995) beschrieben, durchgeführt. Das chromogene Substrat pNPG konnte über das TreA-

Enzym umgesetzt werden, wobei eine gelbliche Farbe entsteht. Dieses Produkt konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifiziert werden.

B. subtilis Stämme, die eine *gbsA-lacZ* Fusion enthielten, wurden in gleicher Weise kultiviert wie die Stämme, die eine *gbsA-treA* Fusion enthielten. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach der Methode von Miller durchgeführt [128]. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umwandlung von oNPG (σ -Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) in Galaktose und σ -Nitrophenol durch die β -Galaktosidase. σ -Nitrophenol ist ebenfalls ein gelber Farbstoff, der bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ bestimmt werden kann. Ob die *gbsA* Genexpression angeschaltet wurde konnte ebenfalls auf SMM Agarplatten nachgewiesen werden, indem das Substrat X-Gal zuvor in die Agarplatten eingegossen wurde (Tabelle 5). Das Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl, welches vom Sauerstoff in einen blauen Farbstoff oxidiert wird.

3.5.3 Bestimmung des intrazellulären Prolin-Pools

Die Quantifizierung von Prolin erfolgte nach der von Bates *et al.* beschriebenen sauren Ninhydrin-Methode [129]. Hierbei reagiert Ninhydrin bei niedrigem pH mit Aminogruppen von Aminosäuren und bildet einen blauen Farbstoff, während bei sekundären Aminosäuren wie Prolin ein roter Farbkomplex gebildet wird. Dieser Komplex konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden. Die Prolinkonzentration nimmt hierbei nach dem Lambert Beerschen Gesetz proportional zur Intensität des roten Farbstoffes zu.

Zur Bestimmung des intrazellulären Prolin-Pools wurden *B. subtilis* Stämme in SMM mit verschiedenen Osmolaritäten bis zu einer OD₅₇₈ von 1.5-1.8 kultiviert. Hierbei wurden teilweise kompatible Solute mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Anschließend wurden 8 ml Bakterienkultur für 8 Minuten bei 5.000 rpm und 20 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei 20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 900 μ l SSA (3% Sulfosalicylsäure) aufgenommen und die Zellen über Nacht bei 20 °C und 750 rpm auf einem Thermoblock aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und 500 μ l des Zellextrakts mit 500 ml Ninhydrin-Lösung (1.25 g Ninhydrin, 30 ml Essigsäure, 20 ml 6 M Phosphorsäure) und 500 μ l Essigsäure versetzt. Die Probe wurde vorsichtig gemischt, für eine Stunde im Wasserbad bei 100 °C gekocht und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 ml Toluol wurden die Proben 30 Sekunden gevortext und bei 5.000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Prolin-Ninhydrin Farbkomplex in der Toluolphase wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 480 nm gegen Toluol als Referenz bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung von Prolin erfolgte unter Verwendung einer Kalibrationsgeraden (0-8 mM Prolin).

3.5.4 Bestimmung von intrazellulären Solut-Pools mittels LC-ESI-MS

Um den intrazellulären Gehalt der kompatiblen Solute Glycin Betain, Homobetain, Cholin und Homocholin messen zu können, wurde der *B. subtilis* Stamm CAB5 in 50 ml SMM mit 1.2 M NaCl und in Anwesenheit der kompatiblen Solute (1 mM) wie in 3.3.2 beschrieben kultiviert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 2-2.5 wurden die Kulturen bei 37 °C und 5.000 rpm zentrifugiert und mit vorgewärmten Kultivierungsmedium ohne kompatible Solute gewaschen. Der Zellextrakt wurde durch eine Extraktion mit 80% Ethanol und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer präpariert. Der Überstand wurde bei -80 °C gelagert. Um die kompatiblen Solute mittels LC-ESI-MS (*Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) detektieren und quantifizieren zu können, wurden zunächst die Reinsubstanzen Glycin Betain, Homobetain, Cholin und Homocholin in einer 70:30 (vol/vol) Mischung von Ammoniumformiat (100 mM Ameisensäure pH 3.77 in Wasser) und Acetonitril über einen Kationenaustauscher [C6–150/2.0 (Metrohm AG)] mit einer Flussrate von 0.2 ml/Minute getrennt. Der Nachweis der Solute wurde mit dem Agilent MSD G1946D Massenspektrometer mit einer Elektrosprayionisationsquelle durchgeführt und die Kationen bei einem m/z 104, 118, 165 und 179 im SIM-Modus detektiert. Die Zellextrakte wurden 1:100 mit H₂O verdünnt und es wurde ein Injektionsvolumen von 5 µl genutzt. Die Kalibrierung erfolgte mit wässrigen Multistandard der kompatiblen Solute im Konzentrationsbereich von 1 bis 60 mg/L. Diese Messungen wurden von Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

3.5.5 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Die Produktion des Regulators GbsR erfolgte im *E. coli* Stamm BL21 in MMA. Zuvor wurde dieser mit dem entsprechenden Plasmid, welches entweder das Wildtyp Gen oder verschiedene Mutanten unter einem induzierbaren Promotor trägt, wie in 3.4.2 beschrieben, transformiert. Für die Produktion wurde zunächst eine MMA-Vorkultur mit Ampicillin (Tabelle 5) mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Dann wurde eine 1 L MMA Hauptkultur im 2 L Erlenmeyerkolben auf eine OD₅₇₈ von 0.1 inokuliert und weiter bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0.5 erfolgte die Induktion des *tet*-Promotors durch Zugabe von 100 µl Anhydrotetracyclin (AHT, 2 mg/ml). Nach weiteren zwei Stunden Inkubation wurden die Zellen 15 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert und das Pellet bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung, ob die Produktion der Proteine erfolgreich war, wurden vor Induktion mit AHT und vor der Ernte Proben entnommen

und diese unter Berücksichtigung der OD₅₇₈ auf einem SDS-Gel, wie in 2.5.7 beschrieben, analysiert.

3.5.6 Proteinreinigung via Strep-Tag-Affinitätschromatografie

Nach der Überproduktion der Proteine wurden die eingefrorenen Zellpellets (aus 1 L) in Resuspensionspuffer (100 mM Tris-HCl pH7.5, 25% Glycerin, 2 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 0.5 mM Pefabloc, 0.5 mM Benzamidin) resuspendiert und die Zellen mit der French Press (French[®] Pressure Cell Press, American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories Inc., Silver Spring, Maryland, USA) aufgeschlossen. Anschließend wurden durch 36-minütige Zentrifugation bei 18.000 rpm und 4 °C die Zelltrümmer vom Zellextrakt getrennt. Für die Aufreinigung des Proteins aus dem Überstand wurde dieser auf eine mit Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) equilibrierte Tropfsäule mit 1 ml Strep-Tactin[®] Superflow[®] Säulenmaterial der Firma IBA GmbH (Göttingen, DE) aufgetragen. Das rekombinante GbsR Protein besitzt einen C-terminalen Strep-Tag[®] II, der an das Säulenmaterial bindet. Um das gewünschte Protein von den anderen Proteinen im Gesamtzellextrakt zu trennen, wurde die Säule nach dem Auftragen des Überstandes mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Elution wurden 10 ml Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM Desthiobiotin) auf die Säule gegeben. Um auch das gebundene Desthiobiotin von der Säule zu lösen, wurde diese mit 10 ml Regenerationspuffer (100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM HABA) regeneriert. Die Eluate wurden anschließend auf einem SDS-Gel auf ihre Reinheit überprüft und die Konzentration des GbsR Proteins am Nano-Drop[®] (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE) gemessen. Wenn eine höhere Konzentration benötigt wurde, wurden die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigt und über eine Membran mit Hilfe eines Zentricons (Vivaspin[®] 6, 20 ml Volumen, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE) ankonzentriert. Die Ausschlussgröße betrug hierbei 10 kDa. Das Protein wurde direkt nach der Ankonzentrierung für EMSA Studien (Kapitel 3.5.9) verwendet.

3.5.7 SDS-PAGE

Mit einer SDS-PAGE können denaturierte Proteine bei angelegter Spannung der Größe nach aufgetrennt werden. Das SDS vermittelt den Proteinen eine negative Ladung, sodass alle Proteine in Richtung der Anode laufen [130]. Es wurden 13.5-15% ige Mini SDS-Gele (8.0 x 6.0 x 0.2 cm) nach Herstellerangaben gegossen (Tabelle 11). Um die Proteinmenge in den Proben zu normieren, wurde die OD₅₇₈ der Kulturen gemessen, 1 ml der Kultur abgenommen und pelletiert. Das Pellet wurde in entsprechender Menge (wenn nicht anders beschrieben normiert auf eine OD₅₇₈ von 10) TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) mit 10 mg/ml Lysozym

aufgenommen. Um den Zellaufschluss zu begünstigen, wurden die Proben für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 x SDS Probenpuffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2.5% SDS; 0.002% Bromphenolblau und 0.71 M β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. 15-20 μ l der Proben und 5 μ l des Größenstandards „PageRuler Prestained“ von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) wurden auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Tris Elektrodenpuffer (25 mM Tris pH 8.3; 192 mM Glycin und 0.1% SDS) bei einer Spannung von 120 V für etwa 60-90 Minuten. Das Gel wurde nun für einen Western Blot genutzt oder die Proteine auf dem Gel wurden für 15 Minuten mit „InstantBlue™ Fast Stain“ Färbelösung von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) angefärbt.

Tabelle 11: Zusammensetzung 15% iges SDS-Gel.

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 13.8 mM SDS	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 13.8 mM SDS	-	2.5 ml
Acrylamid:Bisacrylamid (40%)	3.75 ml	0.875 ml
TEMED	20 μ l	20 μ l
Ammoniumperoxidsulfat	40 μ l	40 μ l
H ₂ O	3.75 ml	6.675 ml

3.5.8 Western Blot und Immunodetektion

Nach der SDS-PAGE konnten die im Gel aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen werden und mittels Antikörper spezifisch gebunden und sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die *B. subtilis* Zellen wie in 3.4.2 beschrieben in 0 M NaCl oder 1.2 M NaCl SMM kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ von 1 wurde 1 ml der Kultur pelletiert und wie in 3.5.7. beschrieben aufbereitet. Für den Western Blot wurde eine Immobilon®-FL PVDF- Membran (Merck KGaA, Darmstadt, DE) in der Größe der jeweiligen SDS-Gele 1 Minute in Methanol aktiviert, in H₂O gewaschen und zwei Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20% Methanol, 0.1% SDS) inkubiert. Für einen Semidry Blot wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman Papiere (Schleicher & Schuell Biosciences GmbH, Dassel, DE) auf die Anode gelegt. Hierauf folgten die Membran, das Gel, und 3 weitere feuchte Whatman Papiere. Jedes Gel wurde 40 Minuten bei 150 mA auf der Trans-Blot® SD Blotting Aparatur der Firma Bio-Rad (München, DE) geblottet. Für die Immunodetektion wurde die Membran über Nacht mit Odyssey Blocking Buffer-TBS von Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE) bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran 1,5 Stunden bei

Raumtemperatur und leichtem Schütteln mit dem in Odyssey Blocking Buffer-TBS und 0,2% Tween20 verdünnten Erstantikörper inkubiert (Tabelle 12). Die Membran wurde dreimal für 5 Minuten bei leichtem Schütteln in TBST (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) gewaschen. Der mit einem Fluoreszenz-Tag versehene Zweitantikörper IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG von Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE) wurde in Odyssey Blocking Buffer-TBS, 0.2% Tween20 und 0.01% SDS verdünnt (Tabelle 12) und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln und leichtem Schütteln darin inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit dem Odyssey Fc Imager der Firma Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE) bei einer Wellenlänge von 800 nm. Der Größenstandard konnte bei einer Wellenlänge von 700 nm gescannt werden.

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

	Antikörper	Spender	Verdünnung	Referenz
Erstantikörper	α -OpuCC	Hase	1:1.250	[37]
	α -OpuBC	Hase	1:2.000	[37]
	α -FLAG	Hase	1:2.500	Sigma ALDRICH
	α -Strep	Hase		
Zweitantikörper	IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG	Esel	1:15.000	Li-Cor Biosciences GmbH

3.5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die zu analysierende 96 bp große DNA Region vor *gbsA* wurde mit dem Primerpaar BS_gbsA_for und BS_gbsA_rev amplifiziert und wie unter 3.4.1 beschrieben gereinigt. Zusätzlich wurde ein 98 bp großes Kontrollfragment, welches im *gbsA* Gen liegt, mit dem Primerpaar BS_gbsA_kfrag_for und BS_gbsA_kfrag_rev amplifiziert. Die reverse Primer wurden jeweils mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dyomics 781 markiert (Mycrosynth AG, Balgach, CH). Parallel hierzu wurde das Protein GbsR mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Kapitel 3.5.6).

In jeden Ansatz (20 μ l) wurden 1 pmol DNA und variierende Mengen des Proteins (5- bis 100-facher Überschuss im Vergleich zur DNA) gegeben. Zu dem DNA Bindepuffer (Endkonzentration 10 mM Tris-HCl pH 8) wurden 1,1 μ g/ μ l Hering Sperm DNA und 7,5% Glycerin gegeben. Nach Inkubation von 15 Minuten wurden die Proben über ein 8% iges TAE-Polyacrylamidgel in 1 x TAE-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM Borsäure und 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt (110 V, 45 Minuten). Die GbsR-DNA Bindung wurde mit dem Odyssey Fc Imager der Firma Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE) bei einer Wellenlänge von 800 nm detektiert.

3.5.10 Transport-Assay mit ^{14}C markierten Substraten

B. subtilis Stämme wurden für Transportstudien in 20 ml SMM mit 0.4 M NaCl wie in 3.4.2 beschrieben bis zu einer OD_{578} von 0.27-0.3 kultiviert. 2 ml der Kultur wurde für den Transport Assay mit radioaktiv markiertem $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glycin Betain (55 mCi/mmol), $[\text{methyl-}^{14}\text{C}]$ -Cholin Chlorid (55 mCi/mmol) und $[\text{N-methyl-}^{14}\text{C}]$ -Carnitin Hydrochlorid (57 mCi/mmol) eingesetzt. Die Endkonzentration der Substrate lag zwischen $3\text{ }\mu\text{M}$ und 20 mM für Glycin Betain, zwischen $3\text{ }\mu\text{M}$ und 10 mM für Cholin und zwischen $3\text{ }\mu\text{M}$ und 1 mM für Carnitin. Zu den unmarkierten Substraten wurde stets $1\text{ }\mu\text{M}$ des radioaktiv markierten Substrates zugegeben. Bei einer kompetitiven Inhibition wurden nicht radioaktiv markierte Substrate als Inhibitoren eingesetzt. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden so eingesetzt, dass eine 50% ige Inhibition im Vergleich zum Transport ohne Inhibitor vorlag. Die genauen Konzentrationen sind den Michaelis-Menten Kurven zu entnehmen. Die exakte Durchführung der Transportstudien wurden ausführlich in Kappes *et al.*, (1996) beschrieben. Die kinetischen Parameter V_{max} , K_{m} und K_{i} wurden mit der Software GraphPad Prism 5 über einen Fit bestimmt (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3.5.11 ^{13}C -NMR

Um eine Aufklärung von Strukturen, die *B. subtilis* als Osmoprotektivum produziert, zu ermöglichen, wurden ^{13}C -NMR Studien durchgeführt. Hierfür wurde *B. subtilis* in 600 ml SMM mit 1.2 M NaCl in einem 2-L Erlenmeyerkolben bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Zu den Medien wurde 1 mM Glycin Betain, Cholin, Homobetain oder Homocholin gegeben. Nach Erreichen einer OD_{578} von 2-2.5 wurden die Zellen pelletiert und eine Extraktion mit 20 ml 80% igem Ethanol wie in Kuhlmann und Bremer (2002) beschrieben durchgeführt. Zelltrümmer wurden durch einen 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 18.000 rpm bei 4°C beseitigt. Der Überstand wurde so lange lyophilisiert, bis die Flüssigkeit getrocknet war. Die lyophilisierten Proben wurden in 0.6 ml $^2\text{H}_2\text{O}$, mit 3 mg D4-3-(Trimethylsilyl) Propionat als interner Standard, aufgenommen. ^{13}C -NMR Spektren wurden bei 75 MHz auf einem Avance II 300 MHz Spektrometer (5 mm BBFO) der Firma Bruker (Bruker, Billerica, MA, USA) aufgenommen und mit dem Programm Topspin 3.1 ausgewertet (Bruker, Billerica, MA, USA). Zur eindeutigen Identifizierung der Peaks wurden die Standards Homobetain, Homocholin und Glutamat mitgemessen.

3.6 Bioinformatische Methoden

Zur bioinformatischen Analyse von OpuB, OpuC und OpuF und deren Gennachbarschaften wurde ein BLAST Algorithmus der Website des "U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute" (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>, (Nordberg 2014) verwendet. Als Ausgangsprotein wurde die Aminosäuresequenz von OpuCC aus *B. subtilis* verwendet. Mit dem Tool Distance Tree auf derselben Website wurden die Stämme herausgefiltert, die keine 16S DNA Information in der SILVA Datenbank [1] gespeichert haben. Mit Stämmen, in denen diese Information vorhanden war, wurde dann der phylogenetische Stammbaum mit Hilfe von iTOL (<http://itol.embl.de/>) konstruiert [131] und mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Software, Ireland) weiterbearbeitet. Beim Vergleich von Basen- oder Aminosäuresequenzen wurde mit dem Onlineprogramm MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) gearbeitet [132]. Modelle von Kristallstrukturen wurden mit Hilfe der Homepage SWISS Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) erstellt [133]. Für die graphische Darstellung von Proteinstrukturen wurde routinemäßig die Software PyMOL verwendet [134].

4. Ergebnisse

4.1 Funktionelle hybride ABC-Transporter aus OpuB und OpuC

Im ersten Teil der Arbeit sollte gezeigt werden, dass das SBP Der OpuB und OpuC ABC-Transporter maßgeblich für das Substratspektrum verantwortlich ist. Hierfür wurden ABC-Transportersysteme konstruiert, welche zum einen kein SPB mehr besaßen und zum anderen in denen die SBPs aus zwei verschiedenen ABC-Transportern ausgetauscht wurden.

4.1.1 Konstruktion und physiologische Charakterisierung der hybriden Transportsysteme

B. subtilis ist in der Lage unter hyperosmotischen Bedingungen zum einen kompatible Solute als Osmoprotektiva zu synthetisieren und zum anderen diese Substanzen über die Opu ABC Transporter in die Zelle zu transportieren (Abbildung 1). Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umgebung wird hierbei aus energetischen Gründen bevorzugt [38, 52, 116, 135].

Es konnte bereits für viele dieser Solute gezeigt werden, dass sie *B. subtilis* in Stresssituationen, vor allem an den Temperaturwachstumsgrenzen (Kälte- bzw. Hitzestress) oder bei hoher Osmolarität, schützen können. Beim Transport dieser großen Bandbreite an Schutzsubstanzen spielt der ABC Transporter OpuC eine große Rolle. Dieser ist in der Lage 16 kompatible Solute in die Zelle zu schleusen [9, 37]. Der zum OpuC System nah verwandte ABC Transporter OpuB besitzt dagegen ein sehr spezifisches Substratspektrum und kann nur ein Substrat hoch affin und ein weiteres Substrat mit moderater Affinität in die Zelle transportieren [37]. Mit Hilfe von Opu Deletionsstämmen (Tabelle 7) wurde ein Wachstumsversuch durchgeführt, in dem die verschiedenen *B. subtilis* Stämme in Hochsalzmedium (1.2 M NaCl) in Ab- und Anwesenheit von verschiedenen kompatiblen Soluten kultiviert wurden. Es wurde zum einen ein Stamm genutzt, in dem die ABC Transporter OpuA, OpuB, OpuC und OpuD deletiert wurden. In diesen Ausgangstamm TMB118 wurden nun weitere Operone, die für verschiedene ABC Transporter kodieren in den chromosomalen *amyE* Locus stabil integriert (siehe 3.4.2). Um die Substratspezifitäten der beiden Transporter OpuB und OpuC unter hochosmolaren Bedingungen zu untersuchen, wurden die zugehörigen Wildtyp Operone integriert (CCB2 und CCB3). Zusätzlich wurden Operone in den Ausgangstamm eingebracht, in denen das Gen für das jeweilige SBP (*opuCC* oder *opuBC*) deletiert wurde. Die mutierten Systeme besitzen demnach kein SBP (OpuBC oder OpuCC) mehr. Diese beiden Stämme LTB15

(OpuB Δ OpuBC) und LTB14 (OpuC Δ OpuCC) wurden ebenfalls in Hochsalzmedium in An- und Abwesenheit von kompatiblen Soluten kultiviert, um die Rolle des SBP beim Transport von kompatiblen Soluten zu analysieren.

In Abbildung 8 wird ersichtlich, dass der Ausgangsstamm, der keine Opu Transporter mehr besitzt, keine osmoprotektiven Fähigkeiten mehr besitzt. Der Stamm kann in Anwesenheit der verschiedenen Substrate nicht besser wachsen als ohne diese Substrate, da er die für deren Aufnahme nötigen ABC Transporter nicht mehr besitzt. Der OpuB⁺ Stamm CCB2 ist in der Lage mit den kompatiblen Soluten Cholin und Carnitin unter hochosmolaren Bedingungen bis auf eine OD₅₇₈ von 1.9 bzw. 2.5 zu wachsen. Allerdings ist erkennbar, dass Carnitin in diesem Stamm scheinbar einen etwas schlechteren osmoprotektiven Schutz im Vergleich zu Cholin bietet, da die OD₅₇₈ geringfügig niedriger ist [46]. Im OpuC⁺ Stamm CCB3 konnten alle genutzten kompatible Solute die Zellen vor Salzstress protektieren und der Stamm konnte auf eine OD₅₇₈ von 2.5-2.9 wachsen. Das Wachstum dieser Kontrollstämme entspricht den Erwartungen, da OpuB ein hoch affiner Cholin Transporter ist und OpuC ein breites Substratspektrum aufweist. Die Fähigkeit des OpuB Transporters, Carnitin in die Zelle zu transportieren, konnte bisher nicht gezeigt werden [37] und ist demnach eine unerwartete neue Erkenntnis (Abbildung 8). Untersucht man das Wachstum der Stämme, in denen kein SBP (OpuBC oder OpuCC) mehr vorhanden ist, ist deutlich zu erkennen, dass beide Stämme nicht mehr in der Lage sind kompatible Solute als Osmoprotektiva unter hochosmolaren Bedingungen zu nutzen. Das Wachstum der Stämme LTB15 und LTB14 gleicht dem des Ausgangsstammes TMB118, in dem keine Opu Transporter mehr vorhanden sind (Abbildung 8). Das Fehlen des SBP in den ABC Transportern OpuB und OpuC führt folglich dazu, dass die Substrate nicht mehr gebunden und an die TMD weitergegeben werden können. Dadurch ist es den Zellen nicht möglich unter Salzstress die kompatiblen Solute in die Zelle zu transportieren und eine Protektion ist nicht mehr möglich [46].

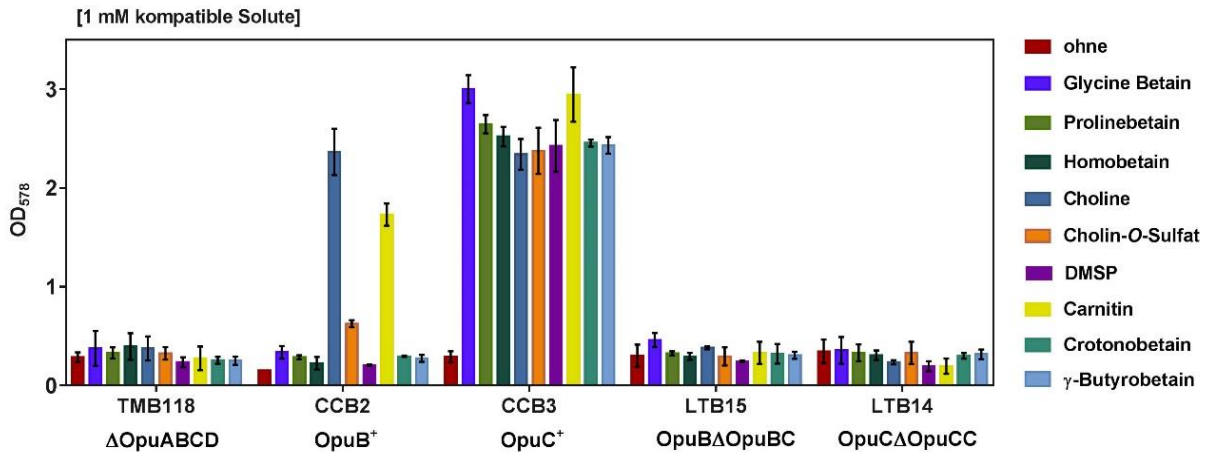


Abbildung 8: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Um zu untersuchen, ob es möglich ist das SBP eines ABC Transporters mit dem eines anderen aber nah verwandten ABC Transporters auszutauschen, wurden zwei hybride ABC Transportsysteme aus OpuB und OpuC konstruiert, da die Komponenten sehr hohe Aminosäuresequenzidentitäten aufweisen (84% für die NBDs OpuBA/OpuCA, 85% für die TMDs OpuBB/OpuCB bzw. OpuBD/OpuCD und 71% für die reifen SBPs OpuBC/OpuCC). Diese hybriden ABC Transportsysteme wurden dann auf ihre Funktionalität mit Hilfe eines Osmoprotektionsassays getestet. Hierbei entstand durch die Transformation des Stammes TMB118 mit dem Plasmid pChen2 (*opuB* Operon, anstelle des *opuBC* Gens besitzt dieses Plasmid an gleicher Stelle das *opuCC* Gen aus dem *opuC* Operon) das Konstrukt OpuB Δ ABC::OpuCC, kurz OpuB::OpuCC (Abbildung 9). Umgekehrt entstand durch die Transformation von TMB118 mit dem Plasmid pChen3 (*opuC* Operon, anstelle des *opuCC* Gens besitzt dieses Plasmid an gleicher Stelle das *opuBC* Gen aus dem *opuB* Operon) das Konstrukt OpuC Δ ACC::OpuBC, kurz OpuC::OpuBC) [46].

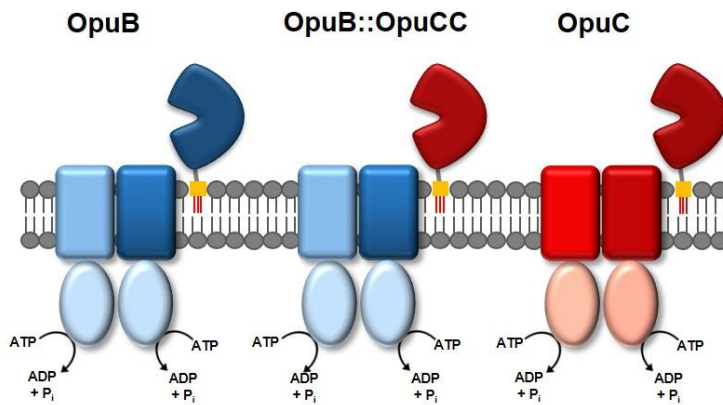


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC.

In blau sind die Komponenten des OpuB Systems (TMDs, NBDs) und in rot die Komponente des OpuC Systems (SBP) gezeigt.

Mittels Western Blot Analysen sollte zunächst nachgewiesen werden, ob die SBPs der konstruierten hybriden ABC Transporter exprimiert und produziert werden. Die Antikörper α -OpuBC (Erkennung von OpuBC und schwächere Erkennung von OpuCC) und α -OpuCC (Erkennung von OpuCC) dienten hierbei als Erstantikörper [37]. Die Stämme JH642, CCB2, CCB3, LTB10, LTB16 und TMB118 wurden unter gleichen Bedingungen wie im Osmoprotektionsversuch bei 1.2 M NaCl kultiviert und die Proben bei einer OD_{578} von 1 wie in 3.3.2 beschrieben geerntet. Es wurde mit allen Stämmen ein Blot mit dem α -OpuBC-Antiserum und ein Blot mit dem α -OpuCC Antiserum durchgeführt (siehe 3.5.8). Auf dem α -OpuBC Blot ist erkennbar, dass das OpuBC SBP sowohl in den Kontrollstämmen JH642 und CCB2 als auch im hybriden Transporter OpuC::OpuBC des Stammes LTB16 produziert wird (Abbildung 10). Die Bandendicke des Stammes LTB16 ist vergleichbar zum Kontrollstamm CCB2. Auf dem gleichen Blot ist zu sehen, dass das Protein OpuCC in den Stämmen JH642, CCB3 und LTB10 ebenfalls vom Antikörper erkannt wurde, jedoch schwächer. Ebenfalls wird deutlich, dass das Bandensignal im Stamm LTB10 im Vergleich zur Kontrolle CCB3 schwächer ist. Diese Auffälligkeit kann im α -OpuCC Blot noch verdeutlicht werden. Dem Anschein nach wird das SBP im hybriden Konstrukt OpuB::OpuCC in geringeren Mengen produziert als im Wildtyp OpuB Konstrukt (Abbildung 10) [46]. Es konnte jedoch durch dieses Experiment für beide Konstrukte sichergestellt werden, dass die SBP in den jeweiligen Stämmen produziert werden.

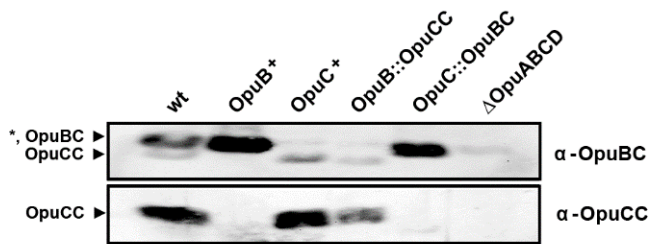


Abbildung 10: Detektion der Proteine OpuBC und OpuCC mittels Western Blot und Immunodetektion.

Verschiedene *B. subtilis* Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von 1 kultiviert und die Zellpellets anschließend wie in 3.5.7 beschrieben für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion aufbereitet. Der Antikörper gegen OpuBC (α-OpuBC) erkennt neben dem Protein OpuBC auch OpuCC, allerdings ist die Bindung zu OpuCC schlechter [37]. Auf gleicher Höhe auf der OpuBC detektiert wird, kann ebenfalls ein weiteres unbekanntes Protein in allen Spuren detektiert werden. Der Antikörper gegen OpuCC (α-OpuCC) bindet ausschließlich das Protein OpuCC [37].

In Abbildung 8 konnte bereits gezeigt werden, dass die SBPs OpuBC bzw. OpuCC der Transporter OpuB und OpuC essentiell für den osmoprotektiven Schutz der Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen sind. Ohne SBP fand kein Transport der kompatiblen Solute statt und die jeweiligen Stämme waren nicht in der Lage zu wachsen. Um zu testen, ob die konstruierten hybriden ABC Transporter funktionell sind wurden diese Stämme ebenfalls in Hochsalzmedium (1.2 M NaCl) in An- und Abwesenheit von kompatiblen Soluten kultiviert und die OD₅₇₈ nach 17 Stunden gemessen.

Die Kontrollstämme JH642, TMB118, CCB2 und CCB3 zeigten das erwartete Wachstumsmuster wie in Abbildung 8. Die *B. subtilis* Stämme, die die hybriden ABC Transporter besitzen, wurden durch die Zugabe verschiedener kompatible Solute im Hochsalzmedium unterschiedlich gut protektiert (Abbildung 11), was darauf schließen lässt, dass beide Transportsysteme funktionell sind. Es konnte somit durch das Implantieren eines fremden SBP ein ABC Transportsystem konstruiert werden, was in der Lage ist die Substrate in die Zelle zu transportieren [46]. Durch den hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC konnte der Stamm LTB10 nun nicht nur mit Cholin und Carnitin, den natürlichen Substraten des OpuB Systems, wachsen sondern war in der Lage mit allen weiteren getesteten kompatiblen Soluten auf eine OD₅₇₈ von mindestens 1.5 zu wachsen. Das Wachstum ohne Osmoprotektiva war im Vergleich hierzu nur sehr schlecht und es konnte nur eine OD₅₇₈ von etwa 0.5 erreicht werden. Vor allem die kompatiblen Solute Glycin Betain, Prolinbetain, DMSP, Crotonobetain und γ-Butyrobetain scheinen neben Cholin und Carnitin über das hybride Konstrukt OpuB::OpuCC gut aufgenommen zu werden. Lediglich mit Homobetain und Cholin-*O*-Sulfat wuchs der Stamm etwas schlechter (bis auf eine OD₅₇₈ von etwa 1.5). Das Substratspektrum des hoch

spezifischen OpuB Transporters konnte durch das Implantieren des OpuCC SBP das Substratspektrum des natürlichen OpuC ABC Transporters erlangen. Allerdings ist ebenfalls erkennbar, dass der hybride Transporter im Stamm LTB10 im Vergleich zum OpuC System im Stamm CCB3 scheinbar ineffizienter ist. Betrachtet man nun das Wachstum des zweiten Konstruktes OpuC::OpuBC im Stamm LTB16 ist erkennbar, dass dieser nur noch in der Lage ist mit den kompatiblen Soluten Cholin und Carnitin bis auf eine OD₅₇₈ von 3 zu wachsen. Die Substrate Prolinbetain, Homobetain, Cholin-O-Sulfat, Crotonobetain und γ -Butyrobetain zeigen nur eine sehr schwache Osmoprotektion und diese Kulturen wuchsen nur auf eine OD₅₇₈ von etwa 1 (Abbildung 11) [46].

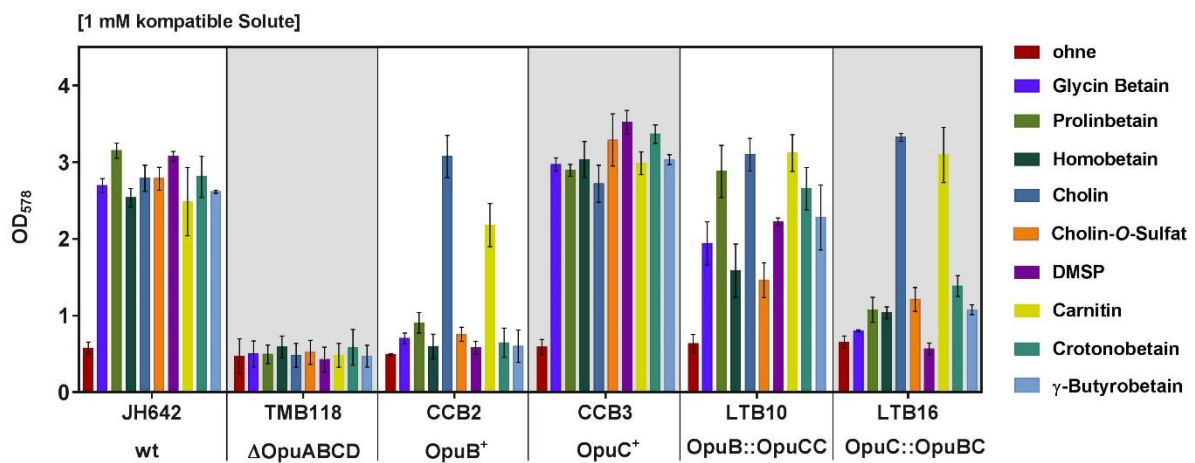


Abbildung 11: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Der hybride ABC Transporter OpuC::OpuBC hat aufgrund der Implantation des SPB OpuBC das Substratspektrum des spezifischen OpuB ABC Transporters bekommen und *vice versa*. Zusammenfassend kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass es möglich war funktionelle hybride ABC Transporter aus OpuB und OpuC zu konstruieren und dass das jeweilige SBP das Substratspektrum des Transporters determiniert [46].

4.1.2 Kinetische Parameter von OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC

Der Wachstumsversuch unter Salzstress konnte zeigen, dass der hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC das Substratspektrum des OpuC Transporters und der hybride OpuC::OpuBC

Transporter das Spektrum des OpuB Systems erlangt hat. Das Implantieren von OpuCC führte also zu einer Erweiterung und die Implantation von OpuBC zu einer Spezifizierung des Substratspektrums. Um beide Systeme im Detail zu studieren, wurden Transport Experimente mit radioaktiv markierten [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Glycin Betain, [$\text{methyl-}^{14}\text{C}$]-Cholin Chlorid und [$N\text{-methyl-}^{14}\text{C}$]-Carnitin Hydrochlorid durchgeführt. Die Aufnahme der Substanzen folgte einer Michaelis-Menten Kinetik, worüber die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert werden konnten.

Das Konstrukt OpuC::OpuBC kann im Vergleich zum OpuC System nun nur noch Cholin und Carnitin transportieren. Die Affinität des hybriden Transporters zu diesen Substraten ist im Vergleich zum OpuB Transporter in etwa gleichgeblieben (K_m Wert von $3\text{ }\mu\text{M}$ für Cholin und 1.14 mM für Carnitin im Vergleich zu $6\text{ }\mu\text{M}$ für Cholin und 3.7 mM zu Carnitin) (Tabelle 13). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) des hybriden OpuC::OpuBC ABC Transporters liegt bei $124\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ für Cholin und bei $308\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ für Carnitin [46]. Da bei der Geschwindigkeit des Transportprozesses nicht nur das SBP, sondern auch die TMD und die NBD beteiligt sind, sollte der V_{\max} Wert nicht nur mit dem OpuB, sondern auch mit dem OpuC System verglichen werden. Es fällt auf, dass der V_{\max} Wert des hybriden Transporters für beide Substrate höher ist als im OpuB und im OpuC Wildtyp System (Tabelle 13). Der hybride Transporter OpuB::OpuCC kann im Vergleich zum OpuB System nun sieben kompatible Solute mehr aufnehmen. Es wurde also nicht nur der Transport von Cholin und Carnitin gemessen, sondern auch der von Glycin Betain. Vergleicht man die Affinitäten des OpuB Transporters mit implantiertem OpuCC mit dem des OpuC Wildtyp Systems fällt auf, dass diese nahezu identisch sind (Tabelle 13). Der Wildtyp OpuC Transporter besitzt eine K_m von $5\text{ }\mu\text{M}$ für Glycin Betain, $27\text{ }\mu\text{M}$ für Cholin und $8\text{ }\mu\text{M}$ für Carnitin, während das hybride OpuB::OpuCC System eine K_m von $6\text{ }\mu\text{M}$ für Glycin Betain, $26\text{ }\mu\text{M}$ für Cholin und $4\text{ }\mu\text{M}$ für Carnitin aufweist. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des hybriden Transporters ist allerdings mit $20\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ für Glycin Betain, $14\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ für Cholin und $14\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ für Carnitin deutlich schlechter im Vergleich zu den Wildtyp Systemen OpuB und OpuC. Dieses hybride Konstrukt ist demnach ineffizienter als das OpuC System, obwohl das Substratspektrum gleich ist. Dennoch ist die Transportleistung ausreichend für eine Akkumulation von kompatiblen Soluten, um osmotisch gestresste *B. subtilis* Zellen zu schützen (Abbildung 8,11) [46].

Tabelle 13: Kinetische Parameter der hybriden ABC Transportsysteme OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC im Vergleich zu den Wildtyp ABC Transportern OpuB und OpuC.

Transporter	Substrat	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	K_m (μM)
OpuC	Glycin Betain	100 ± 5	5 ± 1
	Cholin	81 ± 3	27 ± 4
	Carnitin	94 ± 5	8 ± 2
OpuB::OpuCC	Glycin Betain	20 ± 1	6 ± 1
	Cholin	14 ± 1	26 ± 3
	Carnitin	14 ± 0	4 ± 1
OpuB	Cholin	67 ± 2	3 ± 1
	Carnitin	126 ± 5	1139 ± 127
OpuC::OpuBC	Cholin	124 ± 3	6 ± 1
	Carnitin	306 ± 14	3708 ± 414

Die Michaelis-Menten Kurven sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 58).

4.2 *in-vivo* Austausch der Substratbindeproteine OpuBC und OpuCC

Die konstruierten hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC aus den Wildtyp Transportsystemen OpuB und OpuC konnten in *B. subtilis* eingebracht werden und waren funktionell im Transport von kompatiblen Soluten unter hochosmolaren Bedingungen (Abbildung 11, Tabelle 13) [46]. Es stellte sich nun die Frage, ob *B. subtilis* in der Lage ist ein zusätzlich exprimiertes OpuCC SBP in einem Stamm, in dem nur ein intaktes OpuB System vorhanden ist, zu nutzen, um Substrate, die nicht über den OpuB Transporter in die Zelle gelangen können, bei Salzstress zu transportieren. Hierfür wurde das Gen *opuCC* hinter ein LacI-regulierten und IPTG induzierten Spank Promotor (P_{spank}) kloniert. Dieses Plasmid pLT12 konnte über homologe Rekombination über die Flanken des *ytoI* Gens in das Chromosom von verschiedenen *B. subtilis* Stämmen, wie in 3.4.2 beschrieben, stabil eingebracht werden. Als Kontrollstamm wurde ein Stamm gewählt, in dem nur ein intakter OpuC Transporter vorhanden war (SBB2). Außerdem wurden Stämme gewählt, die entweder nur ein OpuC System ohne das OpuCC SBP oder nur ein OpuB ohne das OpuBC SBP, enthielten. In diesen beiden Stämmen sollte untersucht werden, ob die Zuschaltung des einzelnen OpuCC SBP wieder eine volle Osmoprotektion unter Hochsalzbedingungen bietet. Dies war in den Ausgangsstämmen LTB15 (OpuBΔABC) und LTB14 (OpuCΔACC) durch das Fehlen des jeweiligen SBPs nicht mehr möglich (Abbildung 8).

Um zu testen, ob der *in-vivo* Austausch von OpuCC und OpuBC aus einem intakten OpuB System möglich ist, wurde das Plasmid zusätzlich in den Stamm SBB5 (OpuB⁺) transformiert.

Zunächst wurde mittels Western Blot und Immunodetektion des SBPs OpuCC ausgeschlossen, dass das Protein OpuCC massiv und in zu hohen Mengen produziert wird, sodass es möglicherweise Nebeneffekte geben würde. Die Stämme, in denen das Konstrukt $P_{\text{spank-opuCC}}$ eingebracht wurde, wurden hierfür unter hochosmolaren Bedingungen kultiviert und der Spank Promotor mit 1mM IPTG induziert. In Abbildung 12A ist der Immunoblot zu sehen, auf dem das Protein OpuCC mit Hilfe des α -OpuCC Antikörpers detektiert wurde. Ist der ABC Transporter OpuC bereits vorhanden, ist eine Bande für das SBP OpuCC bereits ohne IPTG Induktion (Spur 1) sichtbar. Dieses Signal wird stärker, wenn das $P_{\text{spank-opuCC}}$ Konstrukt zusätzlich exprimiert wird (Spur 2). In allen weiteren Spuren sind Zellextrakte von Stämmen aufgetragen, in denen kein intaktes OpuC Transportsystem vorhanden ist, weshalb ohne IPTG Induktion keine Bande für das SBP OpuCC vorhanden ist. Wird das Konstrukt $P_{\text{spank-opuCC}}$ wiederum induziert, kann das gebildete OpuCC in allen Stämmen nachgewiesen werden (Spur 4, 6 und 8). Wie zusätzlich im SDS Gel ersichtlich ist, wurde das Protein nicht massiv überproduziert (Abbildung 12B), sodass physiologische Experimente mit diesen Stämmen (LTB35, LTB36, LTB37 und LTB38) durchgeführt werden konnten.

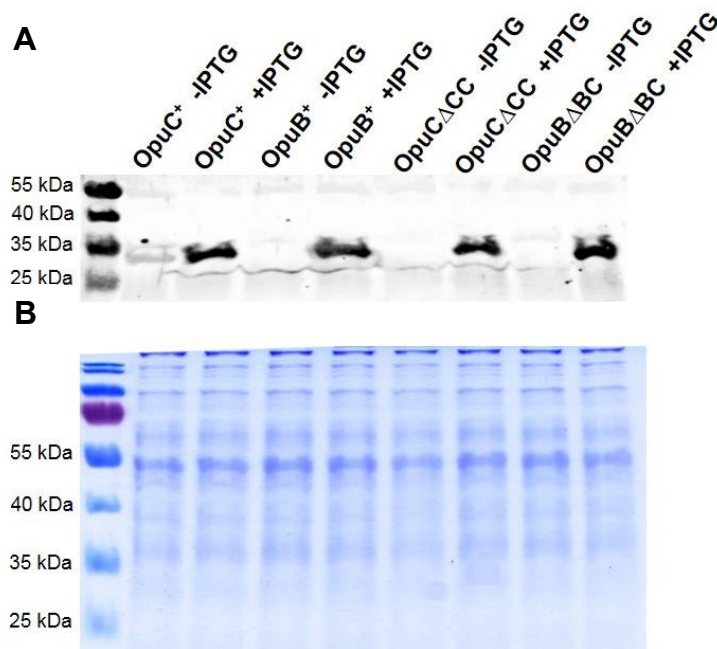


Abbildung 12: Detektion von OpuCC in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion.

Die *B. subtilis* Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD_{578} von 1 kultiviert. In allen getesteten Stämmen ist das IPTG-induzierbare Konstrukt $P_{\text{spank-opuCC}}$ vorhanden, sodass jeder Stamm ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) 1 mM IPTG kultiviert wurde. Die Zellpellets wurden anschließend wie in 3.5.7 beschrieben für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion aufbereitet. Der Antikörper α -OpuCC wurde verwendet, um diese Proteine spezifisch detektieren zu können, da dieser Antikörper nur das SBP OpuCC bindet. (A) Zu sehen ist der Western Blot, auf dem das OpuCC SBP detektiert wurde. (B) Das Referenzgel zeigt, dass die Normierung auf eine einheitliche Zelldichte gelungen ist.

In Abbildung 13 ist ein Osmoprotektionsassay zu sehen, in dem die *B. subtilis* Stämme, die alle das Konstrukt $P_{\text{spank}}\text{-opuCC}$ enthielten, in SMM mit 1.2 M NaCl kultiviert wurden und die OD_{578} nach 17 Stunden gemessen wurde. Zusätzlich wurden 1 mM Glycin Betain, 1 mM Cholin und 1 mM IPTG zur Induktion des Spank Promotors zugegeben. Als Kontrolle diente jeweils eine uninduzierte Kultur ohne IPTG. Der Stamm LTB35 (OpuC^+) ist bereits ohne IPTG Zugabe in der Lage bei Hochsalz mit Glycin Betain und Carnitin zu wachsen, da beide kompatiblen Solute durch das OpuC System transportiert werden können und folglich die Zelle protektiert werden kann. Eine „Zuschaltung“ von OpuCC kann den Transport der Solute in die Zelle nicht beschleunigen, da mit IPTG eine vergleichbare OD_{578} erreicht wurde. Betrachtet man nun das Wachstum der Stämme LTB37 ($\text{OpuC}\Delta\text{CC}$) und LTB38 ($\text{OpuB}\Delta\text{BC}$) ohne IPTG wird deutlich, dass ein SBP erforderlich ist, um Wachstum bei Hochsalz mit kompatiblen Soluten zu ermöglichen. Wird nun das Konstrukt $P_{\text{spank}}\text{-opuCC}$ durch die Zugabe von IPTG induziert, ist im Stamm LTB37 ($\text{OpuC}\Delta\text{CC}$) das gleiche Wachstum mit Glycin Betain und Cholin zu erkennen, wie auch im Wildtypsystem LTB35 (Abbildung 13). Das einzeln exprimierte Protein OpuCC kann nun mit dem SBP-losen Transporter $\text{OpuC}\Delta\text{CC}$ ein funktionales Transportsystem bilden und den Transport von Glycin Betain und Cholin vermitteln. Das synthetisch produzierte Protein OpuCC ist demnach funktionell. Der Transport der kompatiblen Solute wird im Stamm LTB38 ($\text{OpuB}\Delta\text{BC}$) ebenfalls durch die Produktion des OpuCC SBPs verbessert. Konnte dieser Stamm ohne IPTG kaum Wachstum mit Glycin Betain und Cholin zeigen (OD_{578} von etwa 0.8), so wuchs dieser nun nach Induktion mit Glycin Betain auf eine OD_{578} von 1.5 und mit Cholin auf eine OD_{578} von 2.5 (Abbildung 13). Der Stamm LTB36 besitzt ein intaktes OpuB System, in dem auch das SBP OpuBC vorhanden ist. Ohne IPTG-Zugabe, also ohne Induktion des Konstruktes $P_{\text{spank}}\text{-opuCC}$, kann dieser Stamm unter Hochsalzbedingungen nur mit dem kompatiblen Solut Cholin bis auf eine OD_{578} von 4 wachsen, da der OpuB Transporter hochspezifisch für Cholin ist und Glycin Betain nicht transportiert werden kann [37]. Wird nun das OpuCC zusätzlich durch IPTG-Zugabe produziert, so ist dieser Stamm nun in der Lage ebenfalls Glycin Betain als Osmoprotektivum zu nutzen und ebenfalls auf eine OD_{578} von 4 zu wachsen.

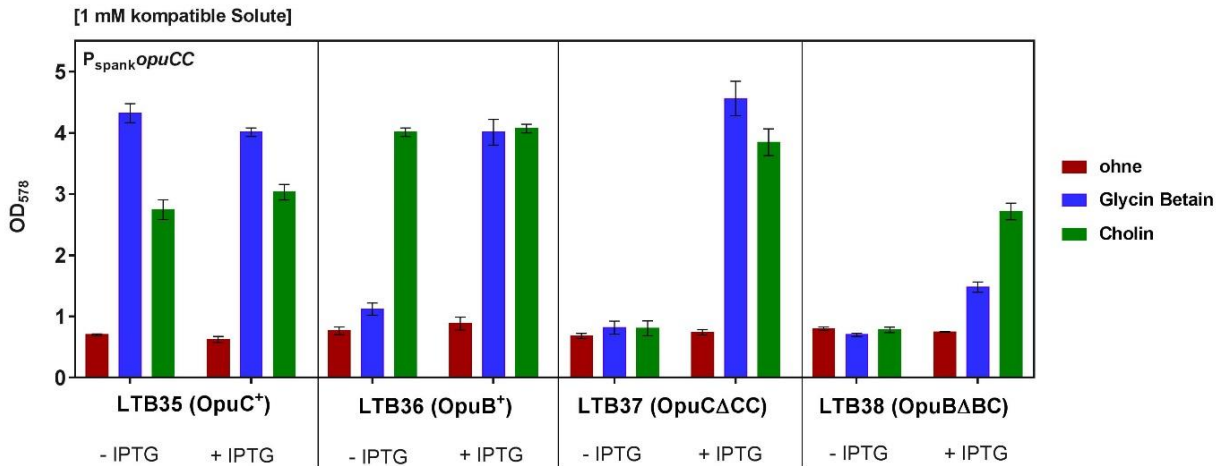


Abbildung 13: Osmoprotektionsassay ohne und mit ektoptischer Expression des Gens *OpuCC* in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen.

Alle getesteten Stämme besitzen das IPTG-induzierbare $P_{\text{spank-}opuCC}$ Konstrukt zur zusätzlichen ektoptischen Expression des *opuCC* Gens. Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl ohne kompatibles Solut und mit 1 mM Glycin Betain oder Cholin und in An- und Abwesenheit von 1 mM IPTG 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD_{578} gemessen. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Dieses Wachstumsexperiment wurde nun mit dem Stamm LTB36 ($OpuB^+$) wiederholt und es wurden alle kompatiblen Solute zugegeben, die durch den ABC Transporter *OpuC* natürlicherweise transportiert werden können. Ohne IPTG zeigt sich der typische Wachstumsphänotyp eines $OpuB^+$ -Stammes (Abbildung 14). Der hochspezifische Cholintransporter kann nur Cholin und weniger gut Carnitin in die Zelle schleusen und somit dem Stamm vor Osmostress schützen [46]. Als positive Wachstumskontrolle wurde das kompatible Solut Prolin verwendet, da dieses Substrat über das Einkomponentensystem *OpuE* transportiert wird [41], welcher in allen verwendeten *B. subtilis* Stämmen intakt ist. Die IPTG-abhängige Expression des $P_{\text{spank-}opuCC}$ Konstruktes führt nun zu einer Erweiterung des Substratspektrums des intakten *OpuB* Transporters, da mit allen kompatiblen Soluten Wachstum im Hochsalzmedium möglich war (Abbildung 18). Das Substratspektrum des *OpuC* Transporters konnte nur durch das einzeln „zugeschaltete“ *OpuCC* SBP erreicht werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Protein *OpuCC* *in-vivo* effektiv mit den TMD des *OpuB* Transporters interagieren kann, obwohl das eigene *OpuBC* SBP ebenfalls vorhanden war.

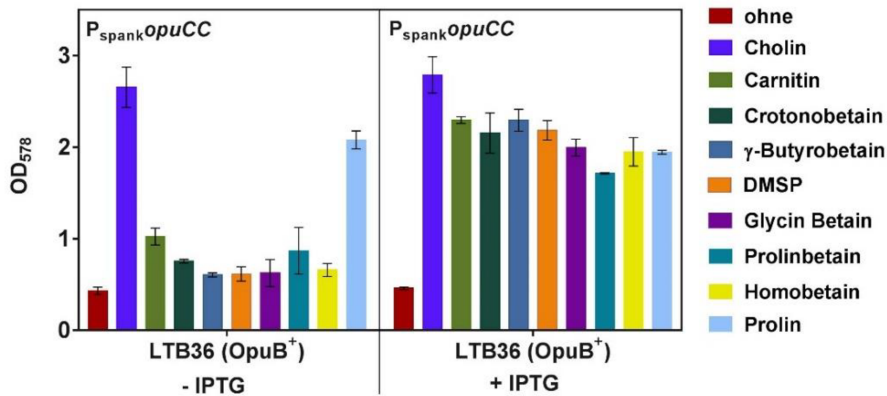


Abbildung 14: Substratspektrum des OpuB Transportsystems unter hyperosmotischen Bedingungen ohne und mit ektopischer Expression des einzelnen *opuCC* Gens.

Der Stamm LTB36 ($OpuB^+$, $P_{spank-opuCC}$) wurde in SMM mit 1.2 M NaCl zum einen ohne kompatibles Solut und zum anderen mit 1 mM verschiedener Osmoprotektiva und in An- und Abwesenheit von 1 mM IPTG 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ gemessen. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

4.3 Aminosäure an Position 74 der reifen SBPs OpuBC und OpuCC determiniert das Substratspektrum des ABC Transporters

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass die SBPs OpuBC und OpuCC der ABC Transporter OpuB und OpuC das Substratspektrum des ganzen Transportsystems determinieren. Durch den Austausch der SBPs wurde das Substratspektrum von OpuC auf den OpuB Transporter projiziert und umgekehrt. Es muss also Unterschiede in den Proteinen OpuBC und OpuCC geben, welche die stark variierenden Substratspezifitäten hervorrufen. Bevor die Aminosäuresequenz und die Struktur der Proteine verglichen werden, soll eine Analyse der phylogenetischen Verbreitung der beiden ABC Transportertypen Aufschlüsse über die mögliche Evolution und Entstehung dieser zwei Opu Transportsysteme geben.

4.3.1 Evolution von OpuB und OpuC: Verbreitung von OpuB und OpuC in der Gattung *Bacillus*

Die Operone *opuB* (*opuBA-opuBB-opuBC-opuBD*) und *opuC* (*opuCA-opuCB-opuCC-opuCD*) liegen im Genom von *B. subtilis* sehr nah beieinander. Lediglich 4.3 kbp liegen zwischen diesen Operonen. Die hohe DNA Sequenzidentität von 75% und die unmittelbare Nähe von *opuB* und *opuC* lassen vermuten, dass eins der beiden Operone durch eine Genduplikation aus dem anderen entstanden ist [37]. Um zu untersuchen, welches Transportsystem in der Evolution früher vorkam wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt und die hierfür verwendeten Stämme auf das Vorkommen der SBPs OpuBC und OpuCC untersucht. Mit Hilfe der Integrated

Microbial Genome and Microbiome Database (iMG/M) des Joint Genome Institute of the US Department of Energy [137] konnten 156 Stämme aus der Gattung *Bacillus* ausgewählt werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur jeweils ein Vertreter pro Spezies gewählt wurde, in dem auch ein Datensatz zur 16S rDNA aus der SILVA Datenbank [1] vorhanden war und dass alle vier Gene, die den Transporter kodieren, vorhanden waren. In diesem Datensatz von 156 *Bacillus* Stämmen wurde nun eine BLAST Analyse mit der Aminosäuresequenz des Proteins OpuCC als Ausgangsequenz durchgeführt. Bei dieser Suche wurden nicht nur OpuCC Homologe gefunden, sondern, aufgrund der hohen Sequenzidentität, ebenfalls OpuBC Homologe und solche Proteine, bei denen das SBP an die TMD anfusioniert ist. Diese Transporter bestanden aus nur zwei Genen im Operon, während die OpuB-Typ und OpuC-Typ Transporter aus vier Genen bestanden und werden erst im Kapitel 4.3 näher analysiert. Alle gefundenen Sequenzen der OpuBC-Typ und OpuCC-Typ Proteine wurden dann mit den *B. subtilis* OpuBC und OpuCC Aminosäuresequenzen verglichen, um zu klassifizieren, ob es sich in dem jeweiligen Stamm um ein OpuB- oder OpuC-Typ Transporter handelt. Da es sich bei den SBPs um die am wenigsten konservierte Komponente handelt, eignen sich die SBPs am besten für die Unterscheidung zwischen OpuBC und OpuCC. In den 156 untersuchten *Bacillus* Genomen wurden insgesamt 210 OpuBC- und OpuCC-Typ SPBs gefunden. 29 Proteine wurden als OpuBC-Typ SPB und 81 Proteine als OpuCC-Typ SPB klassifiziert (Abbildung 17). Diese wurden nun auf den phylogenetischen Stammbaum, der mit Hilfe der 16S DNA der SILVA Datenbank und dem Online-Tool iTOL [131] erstellt wurde, projiziert (Abbildung 15). Auffällig ist, dass das Protein OpuCC (rote Box), und somit auch der ABC Transporter OpuC deutlich häufiger und auch früher gefunden wurde. Es gibt acht *Bacillus* Stämme, in denen mehrere OpuCC Proteine vorhanden sind und 29 Stämme, in denen sowohl OpuBC (blaue Box) als auch OpuCC gefunden wurde. Vor allem fällt aber auf, dass das OpuB Transportsystem nur in einer kleinen Gruppe der *Bacillus* Stämme auftaucht. Diese Gruppe befindet sich im Stammbaum ganz unten, was darauf hinweist, dass diese Stämme die „modernsten“ untersuchten *Bacillus* Stämme sind. Einzig ein Stamm, der neben dem OpuC Transporter ein OpuB System besitzt (*B. sonorensis* L12) ragt aus dieser Gruppe geringfügig heraus (Abbildung 15). Interessanterweise gibt es keinen Stamm, der nur den OpuB ABC Transporter nicht aber das OpuC System besitzt. Hierbei muss aber beachtet werden, dass nur ein Teil der inspizierten Genome vollständig sequenziert wurde (schwarzer Punkt). Die phylogenetische Analyse der beiden ABC Transporter OpuB und OpuC legt nahe, dass der OpuC Transporter, und somit der ABC Transporter mit dem größeren Substratspektrum, in der Evolution früher vorkam als der spezifische OpuB Transporter, was die Hypothese einer Genduplikation bestärkt.

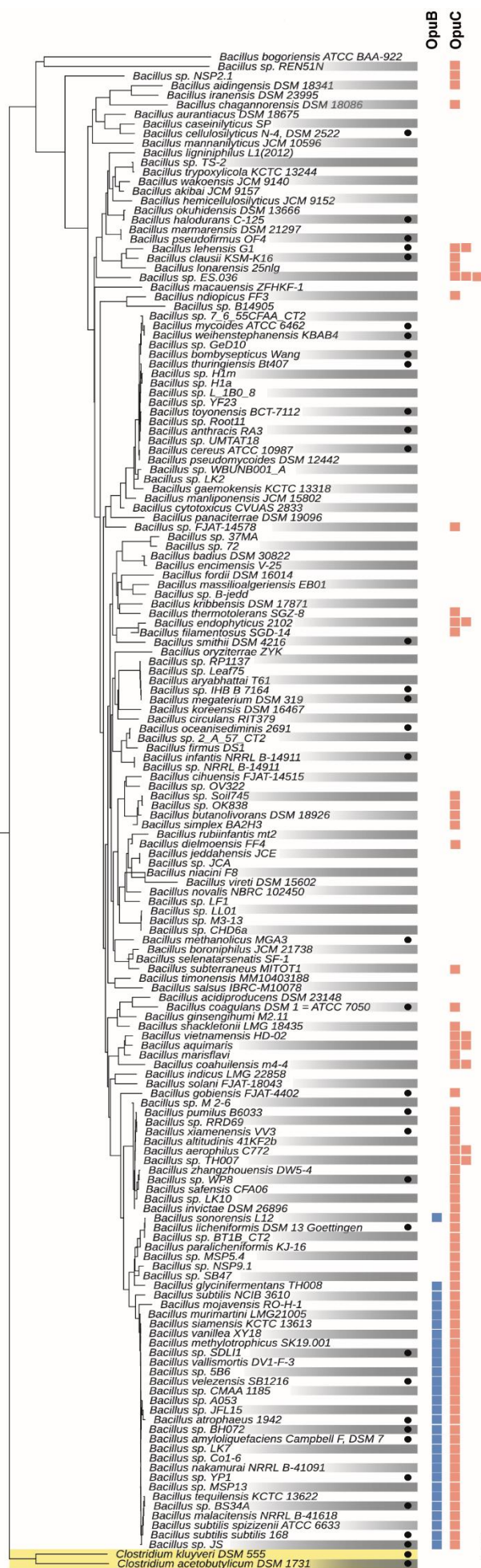


Abbildung 15: Phylogenetische Verbreitung von OpuB und OpuC ABC Transporter in der Gattung *Bacillus*.

Dargestellt ist ein phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Bacillus* basierend auf der 16S rDNA der genutzten Stämme. Es wurde ein Stamm pro Spezies ausgewählt für den 16S rDNA Daten in der SILVA Datenbank [1] vorhanden waren (156 *Bacillus* Stämme. Schwarze Punkte zeigen vollständig sequenzierte Stämme. Als „Outgroup“ dienten zwei Stämme der Gattung *Clostridium* (gelb). Anschließend wurde eine BLAST Analyse mit diesen Stämmen durchgeführt. Die Aminosäuresequenz des SBPs OpuCC diente hierbei als Ausgangssequenz. Alle gefundenen OpuBC-Typ bzw. OpuCC-Typ Proteine wurden durch einen Aminosäuresequenzvergleich mit OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* also OpuBC-Typ (blaue Box) bzw. OpuCC-Typ (rote Box) definiert. Die genaue Durchführung wird in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

4.3.2 Aminosäuresequenzvergleich von OpuBC und OpuCC

Um die in Kapitel 4.1.1 gefundenen SBPs näher zu betrachten, wurden die Aminosäuresequenzen aller Proteine mit Hilfe eines Aminosäuresequenzvergleichs (Online Tool MAFFT [132]) miteinander verglichen um konservierte und wichtige Bereiche der SBPs zu identifizieren. In Abbildung 16 ist ein Aminosäuresequenzvergleich der OpuBC und OpuCC SBPs dargestellt, die aus den 29 *Bacillus* Stämmen stammen, welche beide Bindeproteine besitzen. Ein Sequenzvergleich aller 108 gefundenen Proteine ist im Anhang zu finden (Abbildung 60). Hieraus kann entnommen werden, dass die vier Tyrosine, welche in OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* die aromatische Bindetasche bilden (Abbildung 7, Kapitel 2.2.3), in allen gefundenen SBPs hoch konserviert sind. Es liegt also nahe, dass auch die durch die BLAST-Analyse gefundenen Proteine ebenfalls in der Lage sind Substrate mit einer Trimethylammoniumgruppe wie Glycin Betain oder Cholin mittels Kation- π -Interaktionen zu binden. Pittelkow *et al.* und Du *et al.* konnten bereits zeigen, dass zusätzlich die Aminosäure an der Stelle 74. des SBPs (ohne Signalsequenz) an der Stabilisierung und der Bindung der Liganden beteiligt ist. Im Sequenzvergleich der OpuBC- und OpuCC-Typ Proteine ist erkennbar, dass sich an dieser Position entweder ein Aspartat (wie im *B. subtilis* OpuBC) oder ein Threonin (wie im *B. subtilis* OpuCC) befindet (Abbildung 20).

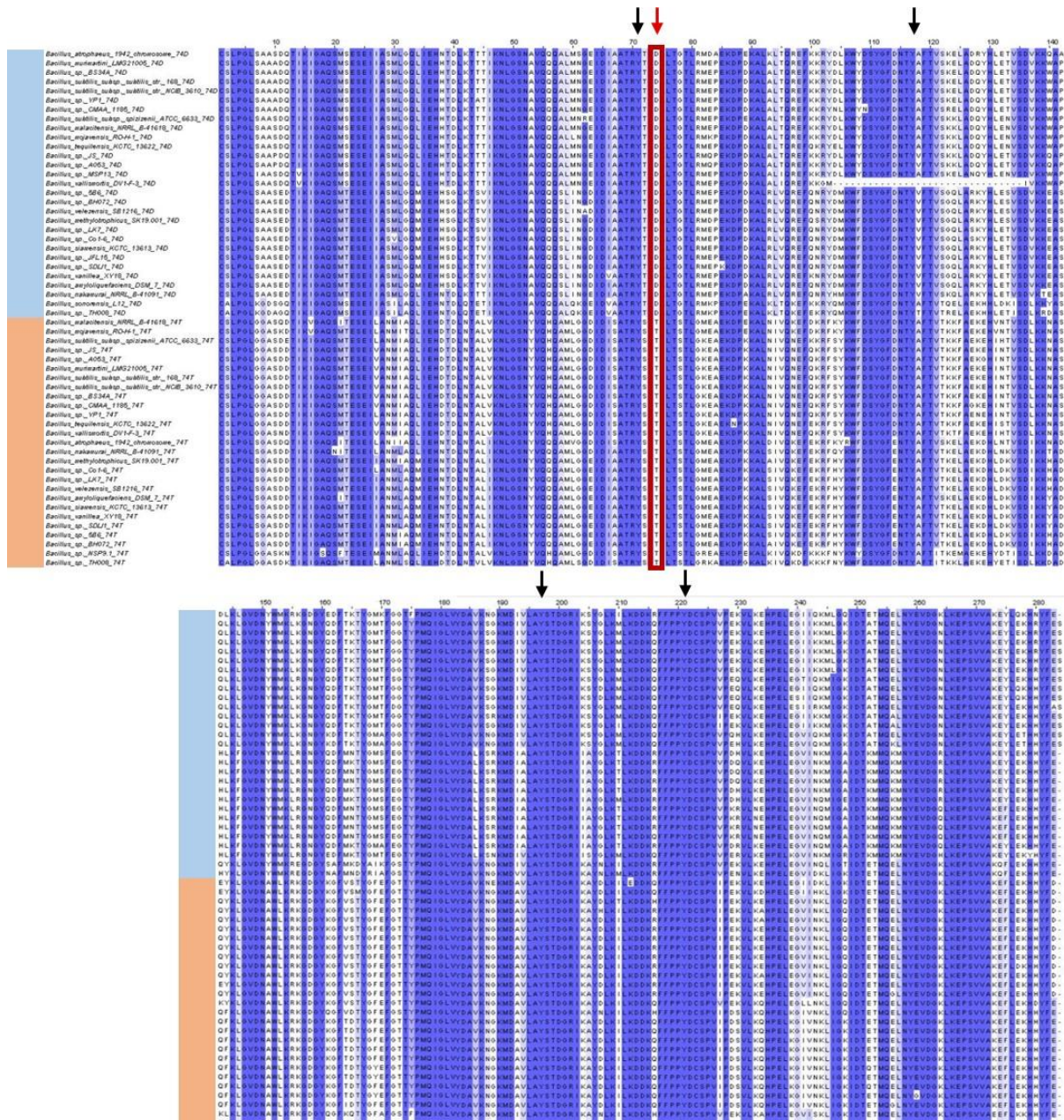
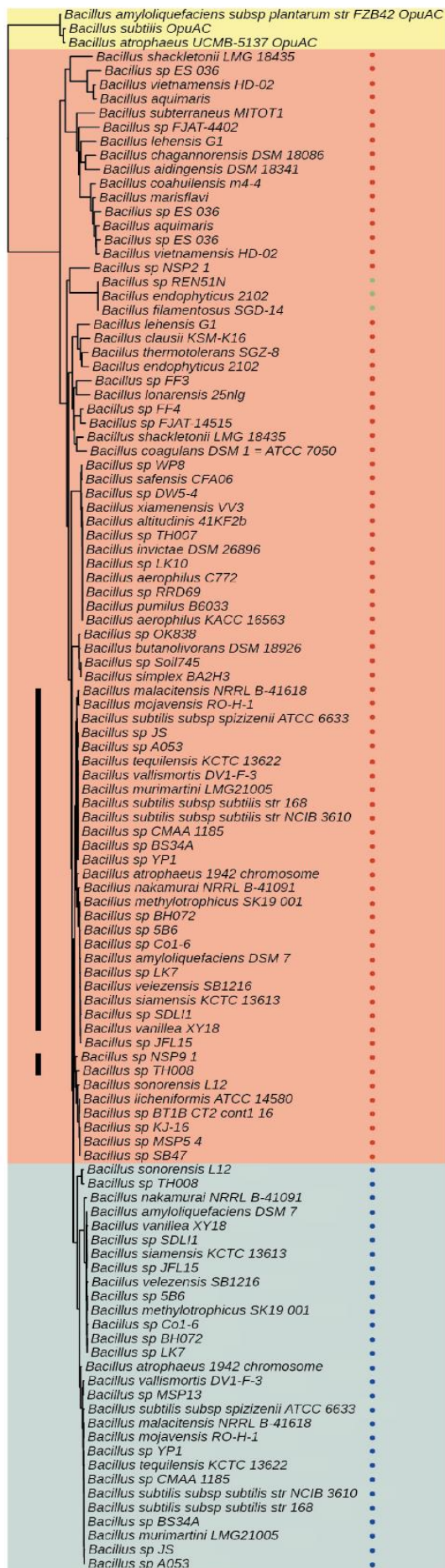


Abbildung 16: Aminosäuresequenzvergleich der OpuBC-Typ und OpuCC-Typ aus den 29 *Bacillus* Stämmen, die jeweils einen OpuB-Typ und einen OpuC-Typ ABC Transporter besitzen.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von OpuBC-Typ (blaue Seitenmarkierung) und OpuCC-Typ (blaue Seitenmarkierung) SBPs ohne Signalsequenz. Schwarze Pfeile markieren die konservierten Tyrosine, die die aromatische Bindetasche formen. Der rote Pfeil markiert die Position 74, welche ebenfalls an der Bindung der kompatiblen Solute beteiligt ist. In den OpuBC Bindeproteinen befindet sich hier ein Aspartat (D) und in OpuCC Proteinen ein Threonin (T).

Um zu analysieren, ob es sich bei den gefundenen OpuBC-Typ Proteinen ebenfalls immer um ein Aspartat und bei den OpuCC-Typ Proteinen immer um ein Threonin handelt, wurde der Aminosäuresequenzvergleich genutzt, um eine „Clade“-Analyse mit Hilfe des Online-Tools iTOL [131] zu generieren. In diesem Sequenz-basierten Baum wurden die Proteine anhand ihrer Aminosäuresequenz sortiert. Als Outgroup dienten hierbei drei verschiedene OpuAC SBPs: OpuAC aus *B. atrophaeus*, OpuAC aus *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* und OpuAC aus

B. subtilis. In rot wurden alle Proteine eingefärbt die eine höhere Aminosäuresequenzidentität zum *B. subtilis* OpuCC Protein besitzen und in blau jede, die eine höhere Aminosäuresequenzidentität zum *B. subtilis* OpuBC SBP aufweisen (Abbildung 17). Schließlich wurde bei jedem Protein untersucht, ob sich an der Position 74 des maturen SPBs ein Aspartat (blauer Punkt) oder ein Threonin (roter Punkt) befindet. Dem Sequenz-basierten Baum aus Abbildung 21 kann demnach entnommen werden, dass alle OpuBC-Typ Proteine an besagter Position ein Aspartat und alle OpuCC-Typ Proteine, mit Ausnahme von drei, ein Threonin besitzen. Bei den drei Ausnahmen befindet sich hier ein Valin, wobei erwähnt werden muss, dass diese drei Sequenzen auch in der Konservierung der Aminosäuren aus dem Muster fallen. Pittelkow *et al.* konnten bereits zeigen, dass in *B. subtilis* eine OpuBC-D⁷⁴A Mutation keine Substratbindefähigkeit mehr besitzt. Anders herum zeigten Du *et al.*, dass die OpuCC-T⁷⁴D Mutante nur in der Lage ist Cholin, nicht aber Glycin Betain und Carnitin zu binden. Beide Studien unterstreichen die Bedeutsamkeit der Aminosäure an Position 74, allerdings wurden nur *in-vitro* Analysen mit den gereinigten Proteinen durchgeführt; die *in-vivo*-Funktionalität wurde bisher nicht untersucht. In den folgenden Kapiteln soll durch *in-vivo*-Experimente untersucht werden, ob die Aminosäure an Position 74 in den SPBs OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* an der Substratbindung beteiligt ist und ob sie sogar die Substratspezifität des ganzen ABC Transporters determiniert.



Tree scale: 0.5

Abbildung 17: Übersicht der Gruppierung von OpuBC- und OpuCC-Typ SBPs.

Das Kladogramm stellt alle OpuBC- und OpuCC-Typ Proteine innerhalb der 158 getesteten *Bacillus* Stämme und basiert auf einem Aminosäuresequenzvergleich dieser Proteine. Alle Aminosäuresequenzen wurden mit der der Proteine OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* verglichen. Proteine mit einer höheren Sequenzidentität zu OpuCC (OpuCC-Typ) befinden sich auf dem roten Hintergrund und die mit einer höheren Aminosäuresequenz zu OpuBC (OpuBC-Typ) auf einem hellblauen Hintergrund. Zusätzlich wurden alle Proteinsequenzen in Hinblick auf das Vorhandensein eines Threonins (roter Punkt) oder eines Aspartats (blauer Punkt) an Position 74 des reifen SBPs untersucht. Drei OpuCC-Typ Proteine besitzen an dieser Stelle ein Valin (grüner Punkt). Der schwarze Balken markiert die OpuCC-Typ Proteine, die in *Bacillus* Stämmen vorkommen, die ebenfalls ein OpuBC-Typ Protein besitzen. Als „Outgroup“ dienten drei OpuAC SBPs von drei verschiedenen *Bacillus* Stämmen (gelber Hintergrund).

4.3.3 Physiologische Charakterisierung der Mutanten OpuBC-D⁷⁴T und OpuCC-T⁷⁴D

Im vorangegangenen Kapitel wurde mit Hilfe von bioinformatischen Analysen festgestellt, dass es sich bei der Aminosäure an der 74. Position des reifen SBPs bei OpuBC-Typ Proteinen in der Gattung *Bacillus* immer um ein Aspartat handelt und bei OpuCC-Typ Proteinen immer ein Threonin vorhanden ist. Du *et al.* und Pittelkow *et al.* konnten zuvor zeigen, dass diese Aminosäure an der Substratbindung beteiligt ist. In Abbildung 18 sind die Substratbindetaschen der SBPs aus *B. subtilis* mit den Liganden Glycin Betain für OpuCC und Cholin für OpuBC dargestellt. Aufgestellt sind Aminosäuren, die an der Substratstabilisierung beteiligt sind, unter anderem die vier Tyrosine die die aromatische Bindetasche bilden [115, 116]. Hier kann die Trimethylammoniumgruppe von Glycin Betain oder Cholin, welche eine positive Ladung besitzt, über Kation- π -Interaktionen stabilisiert werden. In Rot ist die Aminosäure an Position 74 dargestellt. Der Ligand Cholin ist zusätzlich von einem Wassernetzwerk umgeben, welches zusätzliche Stabilisierung ermöglicht. Vergleicht man die Substratbindetaschen von OpuBC und OpuCC, fällt sofort auf, dass die vier aromatischen Tyrosine sehr ähnlich angeordnet sind. Das Glutamin an Position 19 ermöglicht vermutlich eine Bindung zur Hydroxy- bzw. Carboxylgruppe der Liganden. Der einzige Unterschied besteht in der Aminosäure an Position 74.

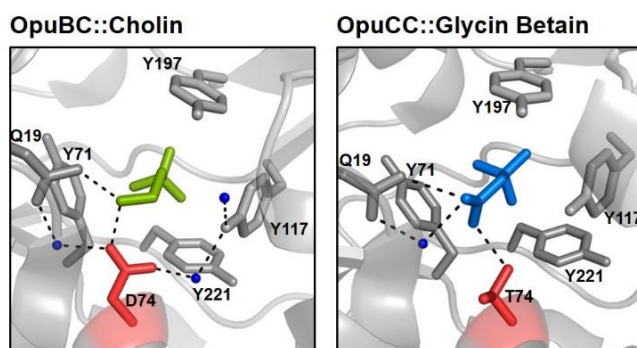


Abbildung 18: Architektur der Substratbindetasche der SBPs OpuBC und OpuCC.

Das Protein OpuBC (PDB: 3R6U) ist im Komplex mit Cholin (grün) und OpuCC (PDB:3PPP) im Komplex mit Glycin Betain (blau) dargestellt. Aufgestellt sind die Aminosäuren, die an der Bindung der Substrate beteiligt sind. In rot ist die Aminosäure an der Position 74 gefärbt; ein Aspartat (D) im OpuBC und ein Threonin (T) im OpuCC. Wassermoleküle sind als blaue Punkte dargestellt.

Im Rahmen der Dissertation von S. Broy konnten durch zielgerichtete Mutagenese Mutanten erstellt werden, in denen diese Aminosäuren ausgetauscht wurden [138]. Es wurden vorläufige physiologische sowie kinetische Analysen der Mutanten OpuBC-D⁷⁴T und OpuCC-T⁷⁴D durchgeführt, die andeuten, dass sich das Substratspektrum verändert hat. Durch Western Blot Analysen wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die extrazellulären SBPs vom Wildtyp OpuBC

bzw. OpuCC und der OpuBC-D⁷⁴T bzw. OpuCC-T⁷⁴D Mutante stabil und im selben Maße exprimiert wurden [138]. Zusätzlich wurde die Mutante OpuBC-D⁷⁴T in Kooperation mit Sander Smits der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit verschiedenen Liganden kristallisiert [138]. Im Folgenden werden detaillierte physiologische Experimente und Transportstudien der Mutante OpuBC-D⁷⁴T aufgezeigt. Hierfür wurde der mutierte OpuB-Transporter (OpuB-D⁷⁴T), in einen Stamm eingebracht, der zum einen keine weiteren Opu-Transporter mehr besitzt und in dem zum anderen der Repressor des *opuB*-Operons GbsR deletiert wurde. Hierdurch konnte die Expression des Genclusters für das OpuB-D⁷⁴T-System dereprimiert werden, was es ermöglichte durch besseres Wachstum das Substratspektrum besser zu deuten. Das Wachstumsexperiment der Transportermutante OpuC-T⁷⁴D wurde in diesem Zuge ebenfalls wiederholt.

In Abbildung 19 ist ein Wachstumsexperiment gezeigt, in dem verschiedene Stämme für 17 Stunden in hochosmolarem Medium (SMM mit 1.2 M NaCl) in An- und Abwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute kultiviert wurden. Alle getesteten Stämme besitzen noch den Prolin Transporter OpuE. Das Wachstum mit Prolin ist demnach in allen Stämmen auf den OpuE zurück zu führen. Die Stämme LTB48, LTB50 und LTB47 besitzen zusätzlich eine *gbsR* Deletion. Betrachtet man die Kontrollstämme LTB48 und SBB6, in denen jeweils OpuB und OpuC intakt sind, ist erkennbar, dass alle kompatiblen Solute in der Lage sind die *B. subtilis* Stämme trotz Salzstress zu protektieren. Ohne diese Substrate ist nur ein Wachstum auf eine OD₅₇₈ von etwa 0.4-0.5 möglich. OpuB und OpuC können in diesen Stämmen den Transport aller kompatibler Solute vermitteln. Die beiden Kontrollstämme LTB50 (OpuB⁺) und SBB8 (OpuC⁺) zeigen das typische und erwartete Wachstumsmuster: der OpuB⁺-Stamm ist in der Lage mit den kompatiblen Soluten Cholin und Carnitin zu wachsen, während der OpuC⁺-Stamm auch mit allen weiteren getesteten Substraten wachsen kann. Vergleicht man nun das Wachstum des Stammes LTB47 (OpuB-D⁷⁴T) mit dem des Kontrollstammes LTB50 (OpuB⁺), wird sofort ersichtlich, dass sich das Substratspektrum erweitert hat. Alle getesteten kompatiblen Solute können durch den mutierten OpuB Transporter in die Zelle gelangen und diese in vollem Maße protektieren, sodass dieser ABC Transporter nun das breite Substratspektrum des OpuC-Systems erlangen konnte (Abbildung 19). Im Gegenzug zeigt die OD₅₇₈-Messung des Stammes SBB10 (OpuC-T⁷⁴D), dass hier ebenfalls das Substratspektrum durch den Aminosäureaustausch im Vergleich zum OpuC Wildtyp System verändert hat. Die kompatiblen Solute Prolinbetain, Homobetain und DMSP zeigen keinerlei Osmoprotektion und die des Substrates Glycin Betain hat sich drastisch verschlechtert. Mit den kompatiblen Soluten Cholin, Carnitin, Crotonobetain und γ -Butyrobetain war der Stamm in der Lage auf eine OD₅₇₈

von 2-2.3 zu wachsen. Es wurde in diesem Falle also nicht durch das Einfügen der Aminosäure Aspartat das Substratspektrum des OpuB Wildtypsystems erreicht, allerdings wurde das breite Substratspektrum des OpuC Systems durch diese Mutation deutlich spezifischer.

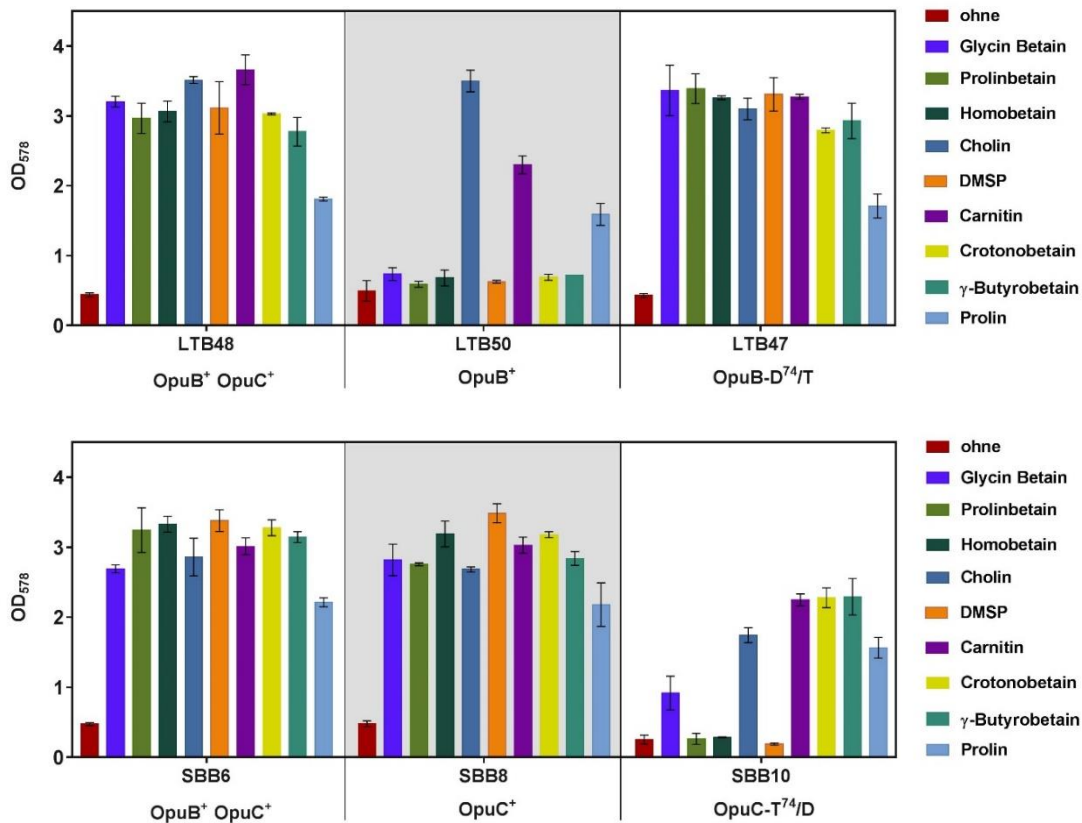


Abbildung 19: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Die Veränderung der Substratspektren durch den einen einzelnen Aminosäureaustausch konnte zusätzlich in Wachstumskurven mit den ausgewählten kompatiblen Soluten Glycin Betain, Cholin, Carnitin und DMSP und den oben gezeigten Stämmen verdeutlicht werden (Abbildung 61). Durch den Aminosäureaustausch D⁷⁴T im SBP OpuBC des OpuB Transporters konnte das Substratspektrum des OpuC-Systems erreicht werden. Die Aminosäure Threonin an Position 74, die natürlicherweise im OpuCC SBP vorkommt, scheint die Bindung vieler verschiedener kompatibler Solute zu ermöglichen. Die Transportermutante OpuC-T⁷⁴D hat durch den einzelnen Aminosäureaustausch ebenfalls ein verändertes Substratspektrum erlangt (Abbildung 19). Das Aspartat, welches an Position 74 des reifen OpuBC SBPs liegt, führt möglicherweise

im OpuCC-T⁷⁴D SBP zu einer Verengung in der Substratbindetasche, sodass nicht mehr alle Substrate in diese hineinpassen.

4.3.4 Kinetische Parameter der Mutanten OpuBC-D⁷⁴T und OpuCC-T⁷⁴D

Im Folgenden wird die Transportermutante OpuB-D⁷⁴T weiter analysiert, da in diesem Fall das exakte Substratspektrum des OpuC ABC Transporters nur durch das Einfügen der Aminosäure Threonin auf das OpuB System projiziert wurde. Um das mutierte OpuB-D⁷⁴T Transportsystem und die Erweiterung des Substratspektrums im Detail zu studieren, wurden Transport Experimente mit radioaktiv markierten [1-¹⁴C]-Glycin Betain, [*methyl*-¹⁴C]-Cholin Chlorid und [*N-methyl*-¹⁴C]-Carnitin Hydrochlorid durchgeführt. Die Aufnahme der Substanzen folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. In Abbildung 20 sind die Michaelis-Menten Graphen der einzelnen Experimente dargestellt. Es wurden wieder die Stämme genutzt, in denen der Repressor GbsR nicht mehr vorhanden war (GbsR⁻), um gleiche Bedingungen im Vergleich zur physiologischen Analyse zu schaffen. Der Wildtyp OpuB Transporter wurde zusätzlich in Anwesenheit von GbsR (GbsR⁺) vermessen, um zu beweisen, dass der Verlust von GbsR keinen Einfluss auf die Affinität zum Substrat (K_m) hat.

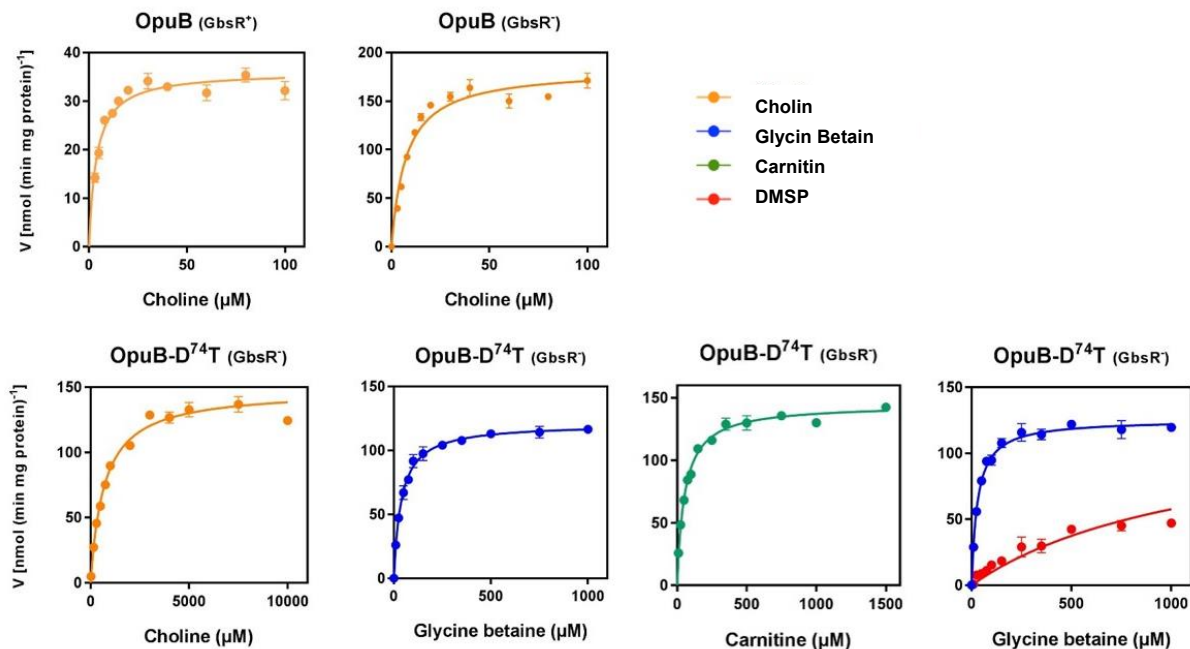


Abbildung 20: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme radioaktiv markierter kompatibler Solute über den OpuB_{wt} und OpuB-D⁷⁴T ABC Transporter.

Als Substrate wurden radioaktiv markiertes Cholin (3 μM-10 mM, gelb), Glycin Betain (3 μM-1.5 mM, blau) und Carnitin (3 μM-1.5 mM, grün) genutzt. Um die Inhibitionskonstante der Mutante OpuB-D⁷⁴T für DMSP (rot) zu bestimmen, wurde 1 mM dieses Substrates als Inhibitor für den Glycin Betain Transport eingesetzt. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung.

Über die Michaelis-Menten Kurven wurden die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert und in Tabelle 14 aufgelistet.

Zunächst sollte gezeigt werden, dass GbsR keinen Einfluss auf die Affinität des SBPs zum jeweiligen kompatiblen Solut hat. Dies konnte durch Messung des Cholintransports über den OpuB Wildtyp ABC Transporter gezeigt werden. Der K_m Wert liegt im GbsR⁺-Stamm bei 4 μM und im GbsR⁻-Stamm bei 7 μM . Die Affinität zu Cholin wurde also durch die Abwesenheit von GbsR nicht verändert. Einzig die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{\max}) wird durch die Derepression der Expression des *opuB* Operons im GbsR⁻ Hintergrund etwa fünffach verbessert.

Tabelle 14: Kinetische Parameter der OpuB-D⁷⁴T Mutante.

Transporter	Substrat	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m/K_i (μM)
OpuB (GbsR ⁺)	Cholin	36 \pm 1	4 \pm 1
OpuB (GbsR ⁻)	Cholin	183 \pm 6	7 \pm 1
OpuB-D ⁷⁴ T (GbsR ⁻)	Cholin	148 \pm 3	691 \pm 52
	Glycin Betain	121 \pm 2	39 \pm 3
	Carnitin	145 \pm 2	54 \pm 3
	DMSP	-	26 \pm 2

In Abbildungen 19 konnte kein Unterschied in der Osmoprotektion von Cholin, Glycin Betain, Carnitin und DMSP in salzgestressten Zellen mit dem OpuB-D⁷⁴T Transporter festgestellt werden. Scheinbar reichten 1 mM der kompatiblen Solute aus, um eine volle Protektion bis auf eine OD₅₇₈ von etwa 3 zu erreichen. Betrachtet man die K_m/K_i Werte für jene Substrate, sind allerdings Unterschiede erkennbar. Scheinbar wurde durch den D⁷⁴T-Austausch im SBP OpuBC die Bindung zum ursprünglich affinen Substrat Cholin etwa 100-fach verschlechtert (Tabelle 14). Allerdings konnten die Substrate Glycin Betain und DMSP nun ebenfalls durch das mutierte OpuB Transportsystem transportiert werden. Diese Substrate erreichen K_m Werte von 39 μM und 26 μM , was bedeutet, dass die neu gewonnen Substrate nur eine fünffach schlechtere Affinität zum mutierten OpuB-D⁷⁴T haben als das natürliche Substrat Cholin zum Wildtyp OpuB System. Die Transportleistung (V_{\max}) war für alle Substrate mit dem OpuB Wildtyp Transporter vergleichbar. Diese ist für eine Akkumulation von kompatiblen Soluten zum Schutz von osmotisch gestressten *B. subtilis* Zellen in allen Fällen ausreichend (Abbildung 19).

4.3.5 Einblick in die Bindungstasche der Mutante OpuBC-D⁷⁴T

Um die Bindung der vier Substrate in der Bindetasche des OpuBC-D⁷⁴T SBPs aufzuklären, wurden in Broy (2015) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sander Smits (Universität Düsseldorf) Kristallstrukturanalysen durchgeführt [138]. Mit Hilfe dieser Analyse konnten wichtige Bindungsmotive aufgeklärt werden. In Abbildung 21 ist die Architektur der Bindetasche des OpuBC-D⁷⁴T Proteins mit Cholin, Glycin Betain, Carnitin und DMSP gezeigt. In allen vier Kristallstrukturen ist der „aromatic cage“, bestehend aus vier Tyrosinen, und in rot der Aminosäureaustausch D⁷⁴T zusehen. Das Threonin bietet den verschiedenen Liganden im Vergleich zum Aspartat im OpuBC Wildtyp SBP (Abbildung 18) mehr Platz in der Ligandenbindetasche (Tabelle 19). Ebenfalls wird in allen Kristallstrukturen deutlich, dass das Glutamin an Position 19 weiterhin an der Substratbindung beteiligt ist.

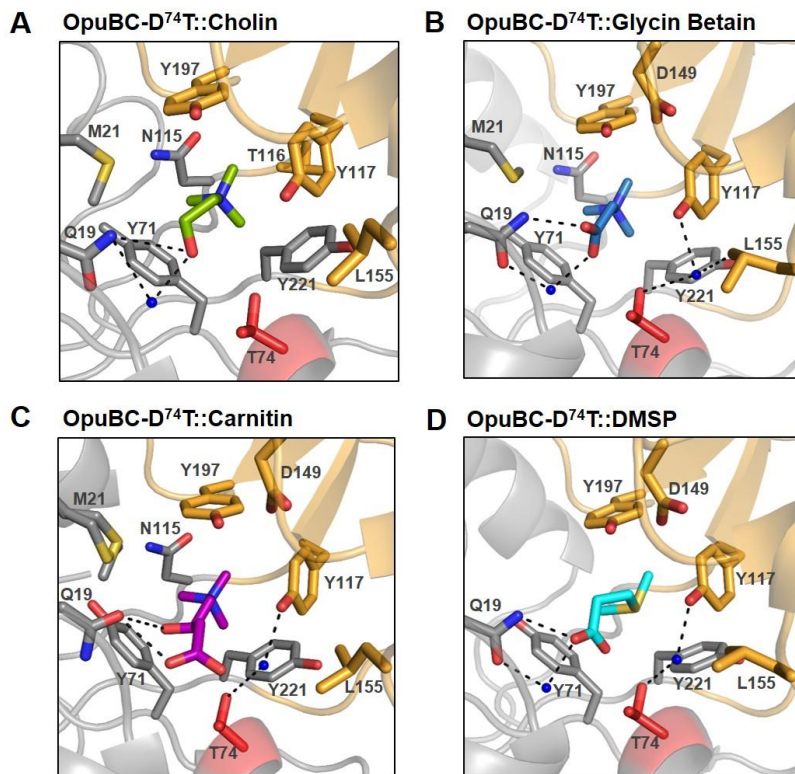


Abbildung 21: Architektur der Substratbindetasche der Mutante OpuBC-D⁷⁴T.

Zu sehen sind Ausschnitte der Kristallstrukturen des Proteins OpuBC-D⁷⁴T in Komplex mit Cholin (A), Glycin Betain (B), Carnitin (C) und DMSP (D). Die zwei verschiedenen und flexiblen Domänen des SBPs sind in grau und gelb eingefärbt. Die vier Tyrosine, welche die Substratbindetasche formen, und weitere Aminosäuren, die an der Bindung der Liganden beteiligt sind, sind aufgestellt. Das Threonin, welches anstelle des Aspartats im Wildtypprotein an Position 74 liegt, ist rot markiert. Das Wassernetzwerk und mögliche Bindungen sind als schwarz gestrichelte Linie dargestellt und Wassermoleküle als blaue Punkte. Die PDB-Dateien sind unter folgenden Codes zu auf der RCSB-PDB Webseite (<https://www.rcsb.org/>) zu finden: 6EYQ (Cholin), 6EYG (Glycin Betain), 6EYL (Carnitin) und 6EYH (DMSP).

Um zusätzlich Aussagen zu den Ladungsverhältnissen in der OpuBC-D⁷⁴T Mutante im Vergleich zum Wildtyp OpuBC Protein machen zu können, wurden nun in Zusammenarbeit mit Dr. Sander Smits (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit Hilfe des Programms PyMOL [134] weitere Berechnungen zur Ladung in den Bindetaschen von OpuBC, OpuCC und OpuBC-D⁷⁴T durchgeführt. In Abbildung 22 sind jeweils Ausschnitte der Bindetasche des OpuBC-D⁷⁴T Proteins zusammen mit den Liganden Cholin, Glycin Betain, Carnitin und DMSP dargestellt. Die Oberfläche und auch die Reste der Substrate wurden rot gefärbt, wenn sich an dieser Stelle eine negativ geladene Aminosäure bzw. eine negativ geladene funktionelle Gruppe, in diesem Falle die Carboxylgruppe, befindet. Eine blaue Färbung kennzeichnet positiv geladene Aminosäuren bzw. die positive Trimethylammoniumgruppe der Liganden. Die OpuBC Wildtyp Substratbindetasche besitzt eine generelle negative Ladung, welche durch die negative Ladung des Aspartats an Position 74 unterstützt wird (Abbildung 22). Die polare und nicht geladene Hydroxygruppe von Cholin wird in dieser Umgebung nicht abgestoßen, vielmehr können sich durch die Hydroxygruppe Wasserstoffbrückenbindungen bilden, was das Cholin zusätzlich im SBP stabilisiert. Cholin ist zudem ein kurzkettiges kompatiblen Solut im Vergleich zu Glycin Betain, Carnitin und DMSP (Abbildung 55), sodass der Platz in der OpuBC Bindetasche ausreicht. Die Ladungsverhältnisse in der Substratbindetasche des OpuCC Proteins sieht durch eine „blaue“ positiv geladene Region, welche sich in Richtung der Restgruppen der Liganden befindet, anders aus. Die negative Ladung des Aspartats⁷⁴ wie sie im OpuBC vorliegt, ist durch das Threonin⁷⁴ in OpuCC nicht mehr vorhanden (Abbildung 22). Gleiches Bild ist in der Mutante OpuBC-D⁷⁴T mit allen vier Liganden zu sehen. Die negativ geladene Carboxylgruppe von Glycin Betain, Carnitin und DMSP wird von keiner negativen Ladung der Bindetasche abgestoßen und kann sogar durch die positive Ladung Bindungen mit dem SBP eingehen und kann dadurch stabilisiert werden. Dies wäre aufgrund der Ladung im OpuBC Wildtyp Protein vermutlich nicht möglich.

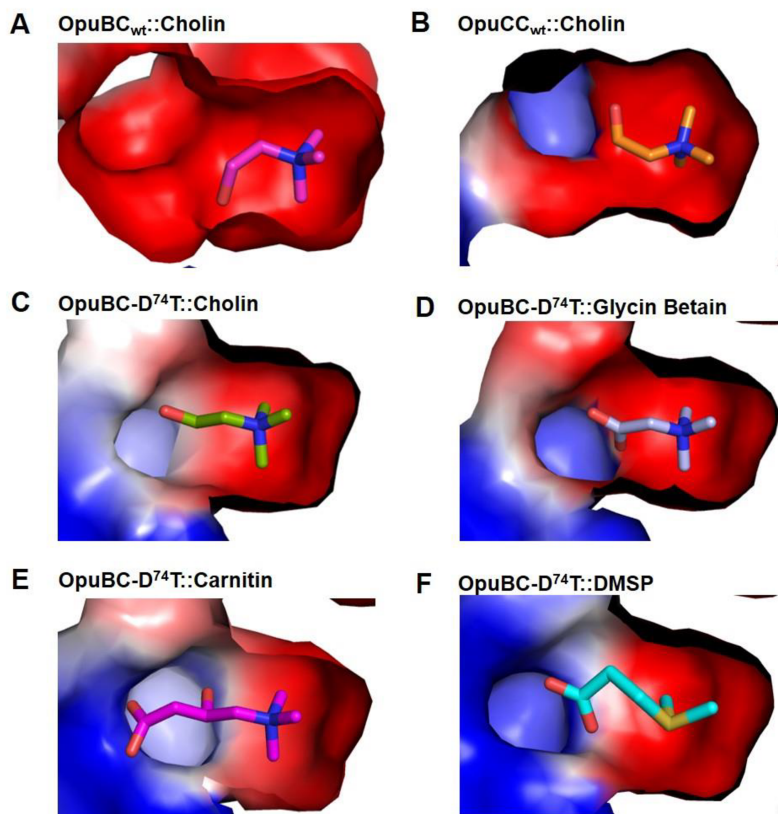


Abbildung 22: Oberflächen- und Ladungsansicht der Substratbindetasche der Proteine OpuBC, OpuCC und OpuBC-D⁷⁴T.

Dargestellt sind Ausschnitte der Ligandenbindetasche der Proteine OpuBC (A) und OpuCC (B) in Komplex mit Cholin und der Mutante OpuBC-D⁷⁴T in Komplex mit Cholin (C), Glycin Betain (D), Carnitin (E) und DMSP (F). Die Oberflächen und auch die Reste der Substrate wurden rot gefärbt, wenn sich an dieser Stelle eine negativ geladene Aminosäure bzw. eine negativ geladene funktionelle Gruppe befindet. Eine blaue Färbung kennzeichnet positiv geladene Aminosäuren bzw. die positive Trimethylammoniumgruppe der Liganden. Die Berechnung der Ladungen wurde von Dr. Sander Smits (Universität Düsseldorf) durchgeführt.

4.4 OpuF - ein neuartiger fusionierter ABC-Transporter für Osmoprotektiva

4.4.1 Phylogenetische Verbreitung des fusionierten ABC-Transporters

In Kapitel 4.1.1 wurde die Verbreitung der ABC Transporter OpuB und OpuC in der Gattung *Bacillus* analysiert. Mit Hilfe einer Blast Suche mit der Aminosäuresequenz des SBP OpuCC als Ausgangssequenz wurden OpuBC-Typ und OpuCC-Typ Proteine gefunden und anhand der Sequenzidentität bestimmt, ob es sich um ein OpuB oder um einen OpuC Transportsystem handelt. Durch die Projizierung auf einen phylogenetischen Stammbaum konnte herausgefunden werden, dass sich das hochspezifische OpuB System vermutlich aus dem nahe verwandten OpuC Transporter entwickelt hat (Abbildung 15). Während dieser Blast Suche konnten nicht nur die SBPs gefunden werden, welche sich im typischen Operon, bestehend aus

vier Genen (NBD, TMD, SBP, TMD), befinden, sondern zusätzlich eine Gruppe, aus denen der ABC Transporter nur aus zwei Genen besteht (Abbildung 23). Hierbei ist das durch den Blast gefundene SPB an die Permeasedomäne des ABC Transporters anfusioniert (Abbildung 23), sodass diese beiden Komponenten nur aus einem Gen bestehen. Beispiele für bereits bekannte derartige Fusions ABC Transporter sind Bile aus *Listeria monocytogenes*, welcher keine kompatiblen Solute transportiert [87], und OpuA aus *Lactococcus lactis*. Dieses Transportsystem ist in der Lage Glycin Betain zu transportieren [86]. Im Folgenden wird der neuartige Transportertyp aus der Gattung *Bacillus* OpuF (fusioniertes SBP an Permease-domäne) genannt. Das TMD-SBP Fusionsprotein wird als OpuFB bezeichnet während das zweite Gen in diesem Operon, welches für die ATPase des Transportsystems kodiert, *opuFA* genannt wird. Die genetische Organisation im Operon ist in Abbildung 23A dargestellt. Da der ABC Transporter nur aus zwei Genen kodiert wird, wird vermutet, dass sich der Transporter aus einem Homodimer zusammensetzt. Eine schematische Darstellung des Transporters ist Abbildung 23B zu entnehmen.

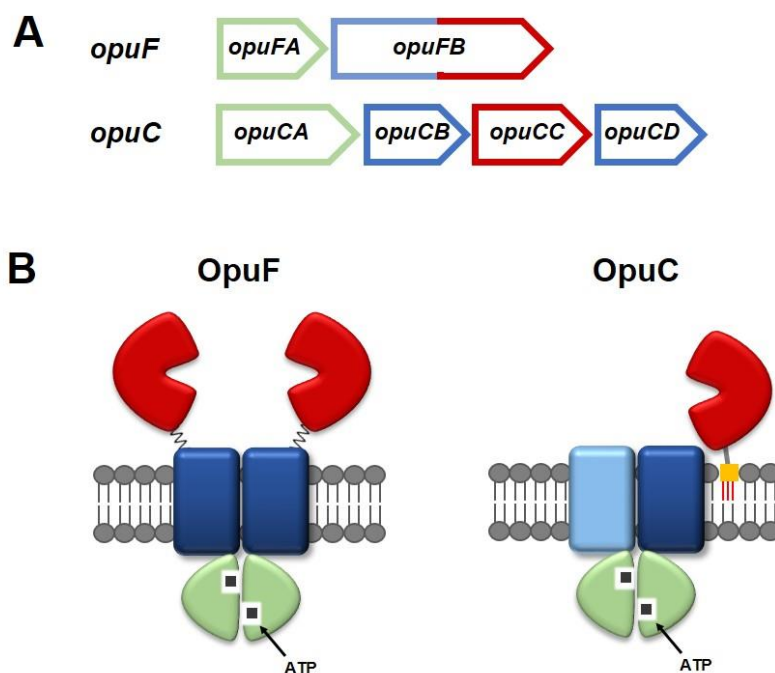


Abbildung 23: Genetische Organisation von *opuFAB* und schematische Darstellung des OpuF ABC Transporters im Vergleich zum OpuC ABC Transporter.

(A) Gezeigt ist zum einen die genetische Organisation der Gene *opuFA* und *opuFB* (A) und eine schematische Darstellung des ABC Transporters (B). *opuFA* kodiert für eine ATPase (grün) und *opuFB* kodiert für das fusionierte TMD-SBP Protein (blau, rot). Die gewellte Linie deutet an, dass die SBP Domäne mit der TMD über einen flexiblen Linker verbunden ist. Zum Vergleich ist ebenfalls das *opuC* Operon und der Aufbau des OpuC Transporters gezeigt. Hierbei ist das SBP über eine Lipid-Modifikation in der Membran verankert.

Um zunächst festzustellen, in wie vielen *Bacillus* Stämmen dieser neuartiger ABC Transporter vorkommt, wurde wie in 4.3.1 beschrieben erneut ein phylogenetischer Stammbaum basierend auf der 16S rDNA Sequenz aus Stämmen der Gattung *Bacillus* erstellt [131] [1]. Bei der Auswahl der Stämme wurde wie in 4.3.1 beschrieben vorgegangen. Verglichen zum phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 15 wurden 18 *Bacillus* Stämme zusätzlich analysiert, sodass insgesamt nicht 157, sondern 175 Stämme der Gattung *Bacillus* betrachtet wurden. Die Blast Analyse ergab 237 Treffer mit OpuCC als Ausgangssequenz. Wurden die Proteine aussortiert, welche im typischen OpuB- bzw. OpuC-Typ Operon, bestehend aus vier Genen lagen, so wurden noch 112 Treffer für SBPs gefunden, in denen das Protein für das SBP an die Permeasedomäne anfusioniert war. Diese Proteine wurden nun auf den neuen phylogenetischen Stammbaum projiziert. Die hohe Anzahl an Treffern (112) für diesen neuartigen ABC Transporter OpuF lässt bereits vermuten, dass dieser Typ weit verbreitet ist. In Abbildung 24 ist diese Verteilung dargestellt. Es wird deutlich, dass der fusionierte ABC Transporter in der Gattung *Bacillus* gleichmäßig verteilt ist. Lediglich in den evolutionär „jüngsten“ Stämmen ist dieser Transportertyp nicht mehr zu finden. Aus Abbildung 15 wird ersichtlich, dass in diesen „moderneren“ *Bacillus* Stämmen vorwiegend der hochspezifische OpuB Transporter vorliegt. Neun der analysierten Stämme besitzen zwei OpuF Transportsysteme, sodass insgesamt 101 der 175 *Bacillus* Stämme (58%) einen fusionierten ABC Transporter besitzen. Hierbei sei zusätzlich gesagt, dass nicht alle in dieser Analyse einbezogenen Stämme vollständig sequenziert sind (vollständig sequenzierte Stämme wurden mit einem schwarzen Punkt markiert), sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass noch weitere diesen Transporter Typ besitzen.

ob OpuF-Typ Transporter auch außerhalb der Gattung *Bacillus* vorkommen, wurde eine erweiterte Blast-Suche in der Ordnung Bacillales durchgeführt (Abbildung 25). Hierbei wurden allerdings nur alle vollständig sequenzierten Stämme analysiert. Auch eine 16S rDNA Sequenz war für diese Analyse nicht notwendig. Die Gattungen *Bacillus* (286 Stämme), *Listeria* (84 Stämme), *Paenibacillus* (50 Stämme) und *Staphylococcus* (180 Stämme) machen den größten Teil dieser Analyse aus (Abbildung 29). Bemerkenswerterweise besitzen alle *Listeria*- und *Staphylococcus* Stämme einen OpuF-Typ ABC Transporter während nur zwei OpuFs in der Gattung *Paenibacillus* (50 Stämme) und 178 in der Gattung *Bacillus* (286 Stämme) vorhanden sind. Zusätzlich wurde mindestens ein OpuF-Typ Transporter in den Gattungen *Fictibacillus* (drei Treffer/Proteine aus zwei Stämmen: 3/2), *Halobacillus* (2/2), *Lentibacillus* (1/1), *Lysinibacillus* (9/9), *Oceanobacillus* (1/1), *Terribacillus* (1/1), *Virgibacillus* (2/2), *Rummeliibacillus* (1/1), *Jeotgalicoccus* (1/1), *Macrococcus* (4/4), *Salinicoccus* (1/2), *Novalibacillus* (1/1) und *Exguobacterium* (11/6) gefunden (Abbildung 25). Insgesamt konnten in den analysierten vollständig sequenzierten Stämmen der Ordnung Bacillales (689 Stämme) 485 OpuF-Typ ABC Transporter gefunden werden. Dieses enorme Vorkommen unterstützt die Vermutung, dass dieser ABC Transporter Typ eine physiologisch wichtige Rolle spielt.

Bacillales	vollständig sequenzierte Stämme	OpuF-Typ Hits
• Alicyclobacillaceae		
– <i>Alicyclobacillus</i>	(2)	0
– <i>Krypidia</i>	(1)	0
• Bacillaceae		
– <i>Aeribacillus</i>	(1)	0
– <i>Amphibacillus</i>	(1)	0
– <i>Anoxybacillus</i>	(4)	0
– <i>Bacillus</i>	(286)	178
– <i>Fictibacillus</i>	(2)	3
– <i>Geobacillus</i>	(18)	0
– <i>Halobacillus</i>	(2)	2
– <i>Lentibacillus</i>	(1)	1
– <i>Lysinibacillus</i>	(9)	9
– <i>Oceanobacillus</i>	(1)	1
– <i>Parageobacillus</i>	(5)	0
– <i>Terribacillus</i>	(1)	1
– <i>Virgibacillus</i>	(2)	2
• Listeriaceae		
– <i>Listeria</i>	(84)	84
• Paenibacillaceae		
– <i>Aneurinibacillus</i>	(1)	0
– <i>Brevibacillus</i>	(3)	0
– <i>Paenibacillus</i>	(50)	2
– <i>Thermobacillus</i>	(1)	0
• Planococcaceae		
– <i>Jeotgalibacillus</i>	(1)	0
– <i>Kurthia</i>	(1)	0
– <i>Planococcus</i>	(8)	0
– <i>Rummeliibacillus</i>	(1)	1
– <i>Solibacillus</i>	(3)	0
– <i>Sporosarcina</i>	(4)	3
• Staphylococcaceae		
– <i>Jeotgalicoccus</i>	(1)	1
– <i>Macrococcus</i>	(4)	4
– <i>Salinicoccus</i>	(2)	1
– <i>Staphylococcus</i>	(180)	180
• Thermoactinomycetaceae		
– <i>Novibacillus</i>	(1)	1
• Unklassifiziert		
– <i>Exiguobacterium</i>	(6)	11
– <i>Gamella</i>	(1)	0
	689	485

Abbildung 25: Phylogenetische Verbreitung von OpuF in der Ordnung Bacillales.

Es wurde, wie in 3.6 beschrieben, eine Blast Analyse mit OpuCC als Ausgangssequenz in allen vollständig sequenzierten Genomen (Anzahl der vollständig sequenzierten Stämme der jeweiligen Gattung in Klammern dargestellt) der Ordnung Bacillales durchgeführt. Alle gefundenen OpuBC-Typ bzw. OpuCC-Typ Proteine wurden aussortiert. Die gefundenen Hits für das fusionierte TMD-SBP Protein OpuFB (insgesamt 485) wurde in rot jeweils hinter die Gattung aufgelistet. Es wurde darauf geachtet, dass auch das Gen für ATPase OpuFA im Operon vorhanden war, weshalb hierbei von OpuF-Typ ABC Transportern gesprochen werden kann.

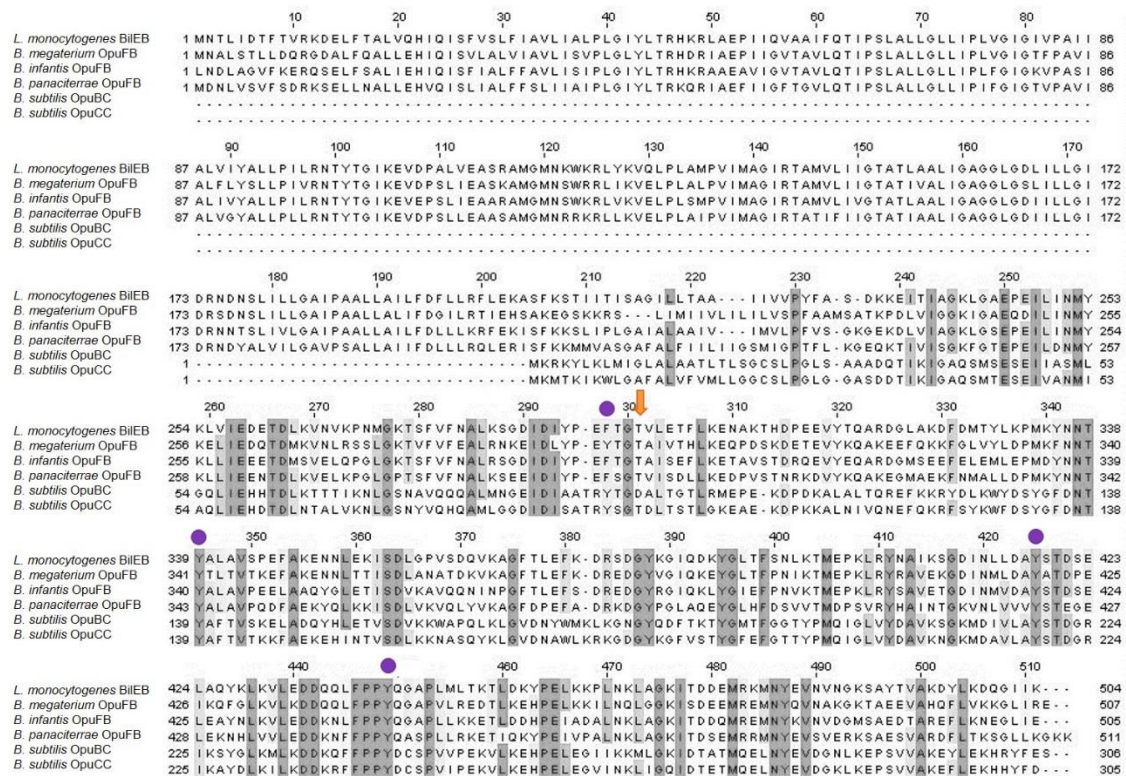
4.4.2 Aufbau und Topologie von OpuF

Um zu überprüfen, ob die OpuF-Typ ABC Transporter ebenfalls in der Lage sind kompatible Solute wie Glycin Betain, Cholin oder Carnitin bei Salzstress in die Zelle zu transportieren und diese somit zu protektieren wurden drei der OpuF Transportsysteme aus der Gattung *Bacillus*

ausgewählt um sie näher zu charakterisieren. Hierfür wurden die OpuF-Transporter aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* zufällig ausgewählt. Zunächst sollte die Aminosäuresequenz des jeweiligen OpuFB Proteins, bestehend aus SBP und TMD, mit der des SBPs von OpuB (OpuBC) und OpuC (OpuCC) verglichen werden, um die Unterschiede der Aminosäuresequenzlängen zu verdeutlichen. Zusätzlich wurde die Aminosäuresequenz des Proteins BileB aus *L. monocytogenes* [87, 139] untersucht, da es sich hierbei um ein bereits charakterisiertes Protein handelt, welches ebenfalls aus SBP und TMD besteht. In Abbildung 26A ist ein Aminosäuresequenzvergleich all dieser Proteine dargestellt. Sofort fällt auf, dass die Sequenzen von BileB und die der OpuFB Proteine aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* länger sind als die der SBPs OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis*. Die transmembrane Domäne der Proteine befindet sich vor dem jeweiligen SBP (AS 1-204). In diesem Teil wurde keine Einfärbung der konservierten Bereiche durchgeführt. Vergleicht man aber die Sequenzen miteinander fällt auf, dass viele Aminosäuren in allen vier Proteinen gleich sind vorliegen (Abbildung 26A).

Im SBP-Teil der fusionierten OpuFB Proteine aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* sollte geprüft werden, ob die aromatische Aminosäurebox, welche typischerweise in SBPs wie auch in OpuBC und OpuCC vorkommt (Abbildung 54), ebenfalls vorhanden ist. In Abbildung 30A ist zu sehen, dass sich an den gleichen Positionen ebenfalls aromatische Aminosäuren befinden (violette Punkte). Lediglich an Position 298 sind neben Tyrosinen auch Phenylalanine zu finden, an den drei weiteren Positionen sind nur Tyrosine vorhanden. Orange markiert wurde die Aminosäure, die sich im OpuBC und OpuCC an Position 74 befindet, ein Aspartat im OpuBC SBP und ein Threonin im OpuCC SBP. An entsprechender Stelle im OpuFB Protein befindet sich in allen drei Fällen ebenfalls ein Threonin, was erste Hinweise gibt, dass, wenn die getesteten OpuF-Transporter funktionell kompatible Solute transportieren, diese möglicherweise ein breiteres Substratspektrum besitzen. In Abbildung 26B wurde eine Topologie Voraussage mit Hilfe des Online-Tools TOPCONS erstellt [140], um stellvertretend den Aufbau des fusionierten Proteins aus *B. infantis* näher zu beleuchten. Hier wird deutlich, dass sich sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins im extrazellulären Bereich befinden. N-terminal beginnen dann nach einer kurzen extrazellulären Region die sechs transmembranen Bereiche (gelb), die die Cytoplasmamembran durchspannen. Anschließend folgt extrazellulär die Substratbindedomäne (grau), in der in violett die aromatischen Aminosäuren und in orange die Aminosäure, die in OpuBC und OpuCC eine sehr wichtige Rolle bei der Substratspezifität spielt (in OpuBC und OpuCC Position 74 des reifen Proteins), markiert wurden (Abbildung 26B).

A



B

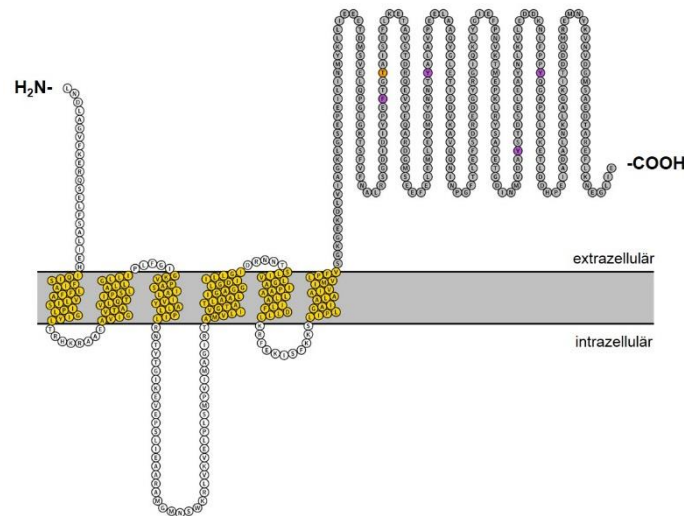


Abbildung 26: Organisation des fusionierten OpuFB Proteins.

Zu sehen ist der Aminosäuresequenzvergleich der Proteine BilEB aus *L. monocytogenes* [87], OpuFB aus *B. megaterium*, OpuFB aus *B. infantis*, OpuFB aus *B. panaciterrae*, OpuBC aus *B. subtilis* und OpuCC aus *B. subtilis*. Es wurden nur die konservierten Bereiche der SBP Domäne grau eingefärbt. Violette Punkte markieren die aromatischen Aminosäuren, die die Bindetasche formen. Ein orangener Pfeil markiert die Aminosäure, die sich im OpuBC und OpuCC an Position 74 befindet und dort eine wesentliche Rolle bei der Determinierung des Substratspektrums spielt (Kapitel 4.1). Im spezifischen ABC Transporter OpuBC aus *B. subtilis* befindet sich hier ein Aspartat (D) und im OpuCC SBP ein Threonin (T). An entsprechender Stelle im OpuFB Protein (Position 296) befindet sich in allen drei Fällen ebenfalls ein Threonin. (B) Es wurde eine Topologie Voraussage mit Hilfe des Online-Tools TOPCONS [140] mit der Aminosäuresequenz des OpuFB Proteins aus *B. infantis* erstellt. Transmembrane Regionen, die die Cytoplasmamembran durchspannen wurden gelb eingefärbt. Violett markiert wurden die Aminosäuren, die die aromatische Bindetasche bilden. Die Aminosäure, die in OpuBC und OpuCC-Typ Proteinen das Substratspektrum bestimmt, wurde orange eingefärbt.

Zur Überprüfung, ob diese vier aromatischen Aminosäuren der SBP Domäne von OpuFB aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* eine Bindetasche formen, wurde ein *in-silico* Model mit dem Online-Tool SWISS-Model [133] berechnet (Modeling-Experimente mit den Online-Tools i-TASSER und PHYRE2 ergaben die gleichen Ergebnisse). Als Ausgangsstruktur für die Vorhersage der Proteinstruktur der SBP-Domänen der fusionierten Proteine diente in allen drei Fällen die Substratbindedomäne BileB (PDB: 4Z7E) aus dem Bile Transporter aus *L. monocytogenes*, welches ebenfalls an eine transmembrane Domäne fusioniert ist [87, 139]. Abbildung 27 zeigt das *in-silico* Model der Substratbindedomäne von OpuFB stellvertretend aus *B. infantis*. Die aromatischen Aminosäuren wurden hervorgehoben und violett gefärbt. Es wird deutlich, dass die Aromaten eine Substratbindetasche formen, ähnlich wie auch in OpuBC und OpuCC (Abbildung 22). Eine Bindung von Trimethylammonium-Substraten mit ihrer positiven Ladung ist in dieser Bindebox durch mögliche Kation- π -Interaktionen gut denkbar. Zusätzlich wurde die Aminosäure hervorgehoben (orange), die das Substratspektrum von OpuB-Typ und OpuC-Typ ABC Transportern determiniert (Kapitel 4.1). Vergleicht man die Aminosäuresequenz aller 112 gefundenen OpuFB Proteine der Gattung *Bacillus* (Kapitel 4.2.1), so fällt auf, dass die Substratbindedomänen an besagter Position immer ein Threonin besitzen (Abbildung 63). Möglicherweise ist diese konservierte Aminosäure ein Hinweis darauf, dass auch in fusionierten SBPs dieses Threonin eine große Rolle bei der Ligandenbindung spielt.

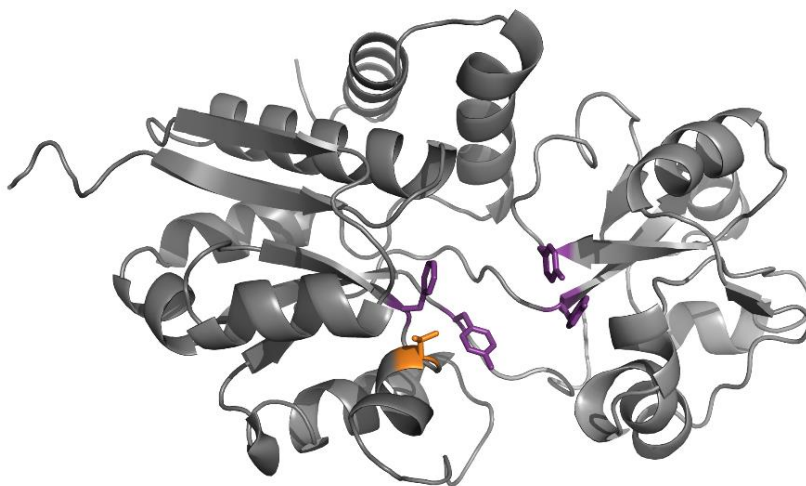


Abbildung 27: *in-silico* Modell der Substratbindedomäne des Proteins OpuFB aus *B. infantis*.

Als Ausgangsstruktur für die Vorhersage der Proteinstruktur der SBP-Domänen der fusionierten Proteine diente in allen drei Fällen die Substratbindedomäne BileB (PDB: 4Z7E) aus dem Bile Transporter aus *L. monocytogenes* [87]. Violett markiert wurden die Aminosäuren, die die aromatische Bindetasche bilden. Die Aminosäure, die in OpuBC und OpuCC-Typ Proteinen das Substratspektrum bestimmt (Position 74 des reifen SBPs), wurde orange eingefärbt. Es handelt sich hierbei um ein Threonin.

4.4.3 Charakterisierung ausgewählter OpuF Transporter im heterologen *B. subtilis* System

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Struktur der Substratbindedomäne der fusionierten OpuFB Proteine bekannten Proteinen, die an Substratbindungen beteiligt, sind stark ähnelt. Sie besitzen ebenfalls eine aromatische Box, in der eine Bindung vor allem positiver Kopfgruppen vorstellbar wäre (Abbildung 27). Um dies zu überprüfen wurden die drei ausgewählten OpuF ABC Transporter aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* näher charakterisiert. Hierfür wurde die chromosomale DNA isoliert und das gesamte *opuF* Operon samt natürlichem Promotor mittels PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde dann in einen Vektor gebracht, der mittels doppelte homologe Rekombination stabil in das Genom von *B. subtilis* in das *amyE* Gen integriert werden konnte. Die Vorgehensweise der Stammkonstruktion kann Kapitel 3.4 entnommen werden. Der Stamm, in den die jeweiligen Konstrukte eingebracht wurden, besaß mit Ausnahme des spezifischen Prolin Transporters OpuE keine weiteren Osmolyt Aufnahmesysteme (Δ OpuABCD) und eine Deletion des MarR-Typ Regulators GbsR. Als Kontrollstämme diente zum einen ein *Bacillus* Stamm der nur den OpuC ABC Transporter besitzt (HKB12) und zum anderen der Ausgangsstamm ohne Opu-Transportsysteme (HKB13). Die Stammkonstruktionen und die physiologische Untersuchung der drei OpuF-Transportsysteme wurden von Henriette Kümmel im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit durchgeführt [141]. Um zu testen, ob die *B. subtilis* Stämme mit den jeweiligen fusionierten OpuF Transportsystemen in der Lage sind unter hyperosmotischen Bedingungen durch Transport vom kompatiblen Soluten die Zelle vor der Plasmolyse zu schützen, wurde ein Osmoprotektionsassay bei 1.2 M NaCl durchgeführt. Die Stämme wurden in An- und Abwesenheit von 1 mM kompatiblen Soluten kultiviert und die OD₅₇₈ nach 17 Stunden gemessen. Als positive Wachstumskontrolle wurde das kompatible Solut Prolin (rosa) verwendet, da dieses Substrat über das Einkomponentensystem OpuE transportiert wird, welcher in allen verwendeten *B. subtilis* Stämmen intakt ist. Der Stamm HKB12 (OpuC⁺) ist in der Lage mit allen kompatiblen Soluten die Zellen zu protektieren (Abbildung 28) [141]. Ein Wachstum war im Vergleich zu ohne Osmoprotektivum (OD₅₇₈ von 0.8) auf eine OD₅₇₈ von 2.5-3.7 möglich. Das breite Substratspektrum konnte bereits in Abbildung 11 beobachtet werden. Der Ausgangsstamm, der nur den Prolin Transporter OpuE besitzt, kann keine weiteren kompatiblen Solute als Schutzsubstanz nutzen da keine Aufnahmesysteme vorhanden sind. Betrachtet man das Wachstum des Stammes HKB8, der den OpuF ABC Transporter aus *B. megaterium* trägt, wird deutlich, dass Kulturen mit Glycin Betain, Prolin Betain, DMSP und γ -Butyrobetain auf eine etwa doppelt so hohe OD₅₇₈ wachsen können im Vergleich zur Kultur

ohne Osmoprotektivum. Mit Homobetain wächst der Stamm drei Mal so gut. Vergleicht man das Wachstum allerdings mit dem Stamm HKB12 (OpuC⁺) so fällt auf, dass dieser eine viel höhere OD₅₇₈ mit kompatiblen Soluten erreicht (2.5-3.7) als der Stamm HKB8 (1-2.1). Der OpuF Transporter aus *B. megaterium* scheint Glycin Betain und dessen Derivate Prolinbetain, Homobetain, DMSP und γ -Butyrobetain zwar in die Zelle transportieren zu können, allerdings nicht so effizient wie der OpuC ABC Transporter aus *B. subtilis* [141]. Die Stämme HKB9 (OpuF_{*B. infantis*}) und HKB15 (OpuF_{*B. panaciterrae*}) weisen einen ähnlichen Wachstumsphänotyp auf (Abbildung 28). Beide Stämme sind in der Lage mit Glycin Betain, Prolinbetain, Homobetain und DMSP auf eine OD₅₇₈ von 3.2-3.9 zu wachsen. Ohne kompatible Solute war durch fehlende Schutzmechanismen nur ein Wachstum auf eine OD₅₇₈ von 0.8 möglich. Die Kulturen mit den anderen getesteten kompatiblen Soluten zeigten kein verbessertes Wachstum [141]. Durch diese Ergebnisse ist bewiesen, dass die beiden OpuF Transportsysteme aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* sehr effiziente Transportsysteme speziell für Glycin Betain, Prolin Betain, Homobetain und DMSP sind, da die *B. subtilis* Stämme mit diesen kompatiblen Soluten vollständig vor Salzstress protektiert wurden. Der OpuF Transporter aus *B. megaterium* scheint dagegen nicht so effizient zu sein oder es gibt im Ursprungsstamm *B. megaterium* weitere Regulationsmechanismen, die in *B. subtilis* nicht existieren oder nicht funktionell sind.

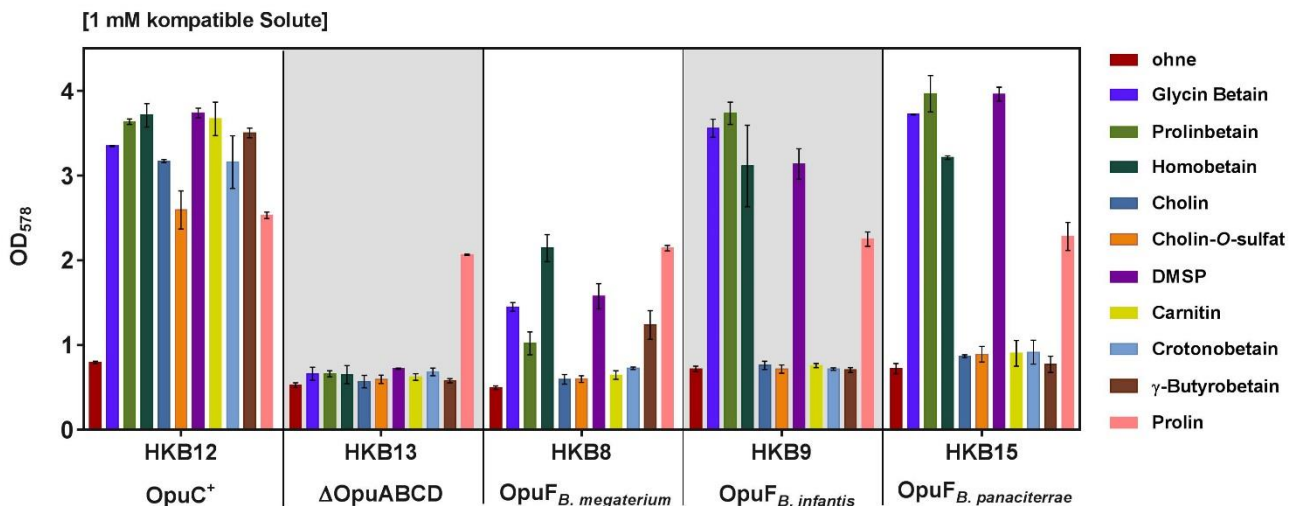


Abbildung 28: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung des Substratspektrums verschiedener ABC Transportsysteme.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Alle verwendeten Stämme besitzen den spezifischen Prolin Transporter OpuE, weshalb dieses kompatible Solut als positive Wachstumskontrolle zugegeben wurde. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Die physiologischen Experimente wurden in Ab- und Anwesenheit von 1 mM kompatiblen Soluten durchgeführt, um das Substratspektrum zu bestimmen. Diese hohen Konzentrationen kommen natürlicherweise vermutlich nicht vor [39, 142], weshalb in diesem Versuch ein erheblicher Überschuss an Osmoprotektivum herrscht. In einem Wachstumsexperiment mit geringeren Konzentrationen des kompatiblen Solutes Glycin Betain (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) wird deutlich, dass die *B. subtilis* Stämme mit den OpuF ABC Transportern aus *B. infantis* (HKB9) und *B. panaciterrae* (HKB15) genau wie der Stamm, der den OpuC ABC Transporter besitzt (HKB12), bereits mit 25 μ M Glycin Betain im Medium vor dem osmotischen Stress geschützt werden (Abbildung 64). Wie erwartet zeigt der Stamm, der das OpuF Transportsystem aus *B. megaterium* besitzt erst ab 1 mM Glycin Betain eine Osmoprotektion (Abbildung 64).

Um die drei OpuF Transportsysteme genauer zu studieren, wurden die kinetischen Parameter mit Hilfe von Transport Experimenten mit radioaktiv markiertem [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Glycin Betain analysiert. Hierbei wurden deutlich geringere Konzentrationen gewählt (3-200 μ M), um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) und die Affinität zum Substrat (K_m) Glycin Betain exakt bestimmen zu können. Über die Michaelis-Menten Kurven (Abbildung 65) wurden die Werte für V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert und in Tabelle 15 aufgelistet. Als Kontrolle diente der OpuC ABC Transporter aus *B. subtilis*. Vergleicht man die K_m -Werte der analysierten ABC Transporter miteinander wird deutlich, dass die Transporter OpuF_{*B. infantis*} und OpuF_{*B. panaciterrae*} ebenso affin Glycin Betain binden und transportieren können (K_m : 4 und 5 μ M) wie das OpuC Transportsystem aus *B. subtilis* (K_m : 7 μ M) (Tabelle 15). Lediglich OpuF_{*B. megaterium*} besitzt eine zehnfach schlechtere Affinität zum Substrat (K_m : 51 μ M). Zusätzlich ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dieses Transporters zehnfach schlechter als die des OpuC Transportsystems aus *B. subtilis* (Tabelle 15). Diese Werte spiegeln den schlechteren Wachstumsphänotyp unter hyperosmotischen Bedingungen wieder (Abbildung 28). Überraschenderweise ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der OpuF Transporter aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* mit V_{\max} Werten von 185 und 208 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ fast doppelt so hoch wie die des OpuC Transportsystems (108 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹) (Tabelle 15), was dafürspricht, dass die beiden OpuF ABC Transporter aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* hochspezifische Glycin Betain Transportsysteme sind. Die aromatische Bindebox, die durch bioinformatische Analysen eine Bindung von positiv geladenen Resten voraussagte, könnte also tatsächlich bei der Bindung der kompatiblen Solute beteiligt sein.

Tabelle 15: Kinetische Parameter der fusionierten OpuF ABC Transporter aus *B. megaterium*, *B. infantis* und *B. panaciterrae* im Vergleich zum ABC Transporter OpuC aus *B. subtilis*.

	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (μM)
OpuC <i>B. subtilis</i>	108 ± 4	7 ± 1
OpuF <i>B. megaterium</i>	10 ± 1	51 ± 5
OpuF <i>B. infantis</i>	185 ± 6	4 ± 1
OpuF <i>B. panaciterrae</i>	208 ± 5	5 ± 1

Die Michaelis-Menten Kurven sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 65).

4.4.4 Einfluss der Mutation OpuFB-T²⁹⁶D auf die Substratspezifität des OpuF Transporters

Wie bereits in 4.2.2 festgestellt, besitzen alle 112 untersuchten OpuFB Proteine aus der Gattung *Bacillus* ein konserviertes Threonin, welches sich in unmittelbarer Nähe der aromatischen Bindebox befindet (Abbildung 26A). In hochspezifischen OpuBC-Typ SBPs befindet sich an dieser Position immer ein Aspartat und in OpuCC-Typ SBPs mit einem breiten Substratspektrum ist immer ein Threonin vorhanden. In Kapitel 4.3 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Threonin in der Substratbindetasche eine Bindung einer Vielzahl von Osmoprotektiva ermöglicht. Ein Aspartat hingegen erlaubt durch Ladung und Größe nur die Bindung von Cholin und Carnitin. Ob das Threonin in den drei untersuchten OpuFB TMD-SBP Proteinen ebenfalls die Substratspezifität des fusionierten ABC Transporter determiniert, sollte mittels zielgerichteter Mutagenese und anschließender physiologischen Untersuchung analysiert werden. Hierbei wurde wie in 4.2.3 beschrieben vorgegangen. Der Stamm HKB9 besitzt den OpuF ABC Transporter aus *B. infantis*. In Abbildung 28 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Transportsystem in der Lage ist Glycin Betain, Prolinbetain, Homobetain und DMSP zu transportieren. Der Stamm wird also bei Hochsalz in Anwesenheit der genannten kompatible Solute vor dem Salzstress protektiert. Dieser Wachstumsphänotyp konnte in Abbildung 29 reproduziert werden. Wird nun das Threonin, welches sich im fusionierten TMD-SBP Protein an Position 296, und im OpuCC Typ Protein an Position 74, zu einem Aspartat mutiert (T²⁹⁶D), so kann der resultierende Stamm (HKB16) mit keinem der getesteten Substrate mehr protektiert werden (Abbildung 29). Auch die korrespondierende T/D-Mutanten des OpuFB Proteins aus *B. megaterium* und *B. panaciterrae* waren nicht in der Lage mit kompatiblen Soluten im Medium höher zu wachsen als ohne (Abbildung 66).

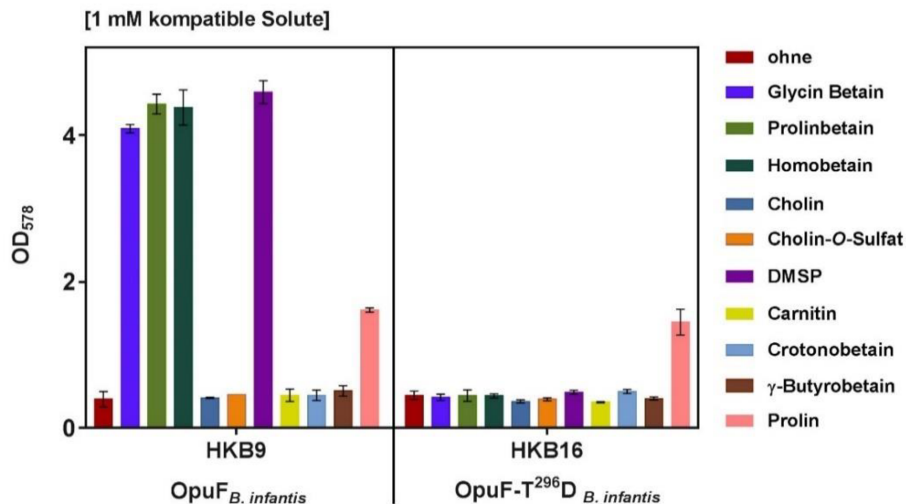


Abbildung 29: Wachstumsanalyse der Mutante OpuF-T²⁹⁶D unter hyperosmotischen Bedingungen zur Bestimmung der Substratspezifität.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Beide verwendeten Stämme besitzen den spezifischen Prolin Transporter OpuE, weshalb dieses kompatible Solut als positive Wachstumskontrolle zugegeben wurde. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass das korrespondierende Threonin auch in der Substratbindedomäne von fusionierten SBPs essentiell ist für die Bindung der kompatiblen Substrate Glycin Betain, Prolinbetain, Homobetain und DMSP. In diesem Falle führte das Asparat dazu, dass keine Bindung mehr möglich war. Das Substratspektrum wurde minimiert (Abbildung 29) und dadurch, dass bereits vorher keine Bindung von Cholin und Carnitin möglich war, ist das Protein nicht mehr in der Lage Osmoprotektiva zu binden und folglich deren Transport bei Salzstress in die Zelle über den fusionierten ABC Transporter OpuF zu vermitteln.

4.5 Charakterisierung von GbsR mit Hilfe eines Suppressor-Screens

4.5.1 Effizienzsteigerung durch Suppressor-Screen und Physiologie einiger Suppressor Mutanten

In Kapitel 4.1. konnte gezeigt werden, dass der hybride ABC Transporter OpuB::OpuCC nicht die gleiche Transportkapazität wie der OpuC Transporter besitzt, obwohl die Substratspektren gleich sind. Der Stamm LTB10 (OpuB::OpuCC) wird in hochosmolarem Medium durch die kompatiblen Solute nicht so gut protektiert wie der Stamm CCB3 (OpuC⁺) (Abbildung 11) und

auch die maximale Transportgeschwindigkeit der Solute in die Zelle ist beim Stamm LTB10 (OpuB::OpuCC) schlechter als im Stamm CCB3 (OpuC⁺) (Tabelle 13). Eine mögliche Hypothese für dieses Phänomen könnte zum einen sein, dass das „fremde“ SBP OpuCC nicht perfekt auf die Membranproteine OpuBB und OpuBD passt und dadurch der Transportvorgang der Substrate verschlechtert wird. Eine Inspektion der Ladungen an OpuBC und OpuCC, sowie an den Transmembranproteinen OpuBB/OpuBD und OpuCB/OpuCD zeigte allerdings keine Unterschiede [136]. Eine zweite Möglichkeit für eine verschlechterte Transportkapazität im Transporter OpuB::OpuCC wäre eine zusätzliche Substraterkennung im Transportkanal der TMD von OpuB. Es wurde ein Suppressor Screen entwickelt, in dem das schlechtere Wachstum des Stammes LTB10 (OpuB::OpuCC) im Vergleich zum Stamm CCB3 (OpuC⁺) zu Nutze gemacht wurde [46]. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass eine Reduzierung der Glycin Betain Verfügbarkeit (50 μ M) im hochosmolaren Medium dazu führt, dass der Kontrollstamm CCB3 mit dem OpuC Transporter weiterhin protektiert werden kann und der Stamm LTB10 mit dem hybriden Transporter nur noch ein sehr schlechtes Wachstum zeigt.

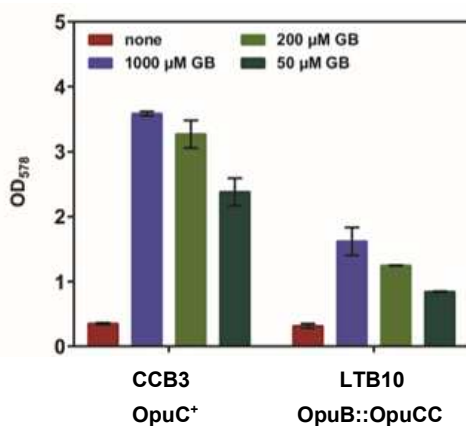


Abbildung 30: Wachstumsvorteil des Stammes CCB3 gegenüber LTB10 unter hyperosmotischen Bedingungen mit verschiedenen Glycin Betain Konzentrationen.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM (blau), 200 μ M (hellgrün) oder 50 μ M (dunkelgrün) Glycin Betain 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Um Suppressoren zu isolieren, die durch Mutieren von Genen, welche möglicherweise für die Verschlechterung der Transportkapazität des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC verantwortlich sind, wieder einen Wachstumsvorteil erlangen, wurde ein hochosmolares Festmedium (1.1 M NaCl) mit limitierten Glycin Betain (50 μ M) hergestellt. Auf dieses Nährmedium wurden 100 μ l einer 10⁻¹ Verdünnung der Stämme CCB3 und LTB1 ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die *B. subtilis* Stämme wurden zuvor in einer SMM Vorkultur mit 0.4 M NaCl an die erhöhte Osmolarität adaptiert. Bereits nach einem Tag war der Stamm CCB3

(OpuC⁺) in der Lage einen Rasen zu bilden (Abbildung 13A), da die limitierte Glycin Betain Konzentration ausreicht, um den Stamm vor osmotischen Stress zu schützen (Abbildung 12). Der Stamm LTB1 (OpuB::OpuCC) wies erst nach fünf Tagen Wachstum in Form von gut gewachsenen Kolonien auf. Ein Bakterienrasen konnte nicht gebildet werden (Abbildung 13A). Diese Kolonien wurden nun zwei Mal auf gleichem Medium fraktioniert ausgestrichen, um eine Reinigung der Klone zu erreichen. Nach der Reinigung konnten die Mutanten, welche vom „Vaterstamm“ LTB1 abstammen, in Vollmedium kultiviert, in Stammhaltung genommen und weiter charakterisiert werden.

Zunächst wurde getestet, ob die Suppressor Mutanten nun einen Wachstumsvorteil gegenüber ihres Vaterstammes LTB1 haben. Hierfür wurde zunächst von drei dieser Stämme [LTB3 (M1), LTB4 (M2), LTB5 (M3)] eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ erstellt und jeweils 5 µl der Verdünnungen auf das gleiche Festmedium getropft, welches auch für die Isolation genutzt wurde (1.1 M NaCl, 50 µM Glycin Betain). Als Vorkultur und Verdünnungsmedium diente 0.4 M SMM. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C war das Wachstum des Kontrollstammes CCB3 (OpuC⁺) bis zu einer Verdünnungsstufe von 10⁻⁵ sichtbar (Abbildung 13B). Wie erwartet wuchs der Vaterstamm LTB1 mit dem hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC schlechter, sodass nur ein Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10⁻² erkennbar war. Alle drei getesteten Suppressor Stämme wuchsen deutlich besser als deren Vaterstamm LTB1 [46]. Die Stämme LTB3 und LTB4 zeigten den gleichen Wachstumsphänotyp des Kontrollstammes CCB3 (bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁵), während der Stamm LTB5 bis 10⁻³ gewachsen ist (Abbildung 13B).

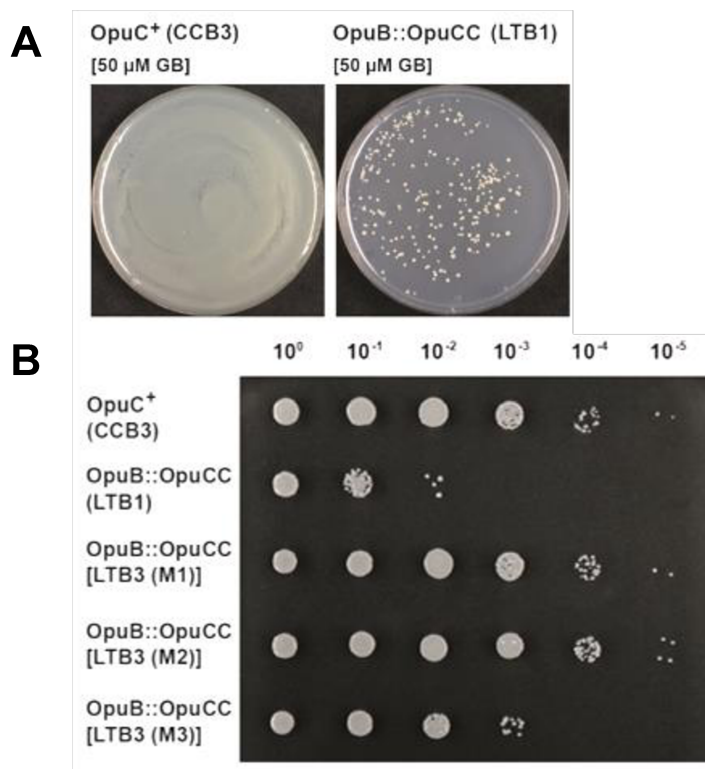


Abbildung 31: Suppressor-Screen und Wachstumsanalyse drei isolierter Suppressor Mutanten.

(A) Gezeigt sind zwei Agarplatten mit SMM mit 1.1 M NaCl und 50 µM Glycin Betain. Auf diesem Hochsalzmedium mit limitierten Glycin Betain Konzentrationen wurden die Stämme CCB3 (OpuC⁺) und LTB1 (OpuB::OpuCC) plattiert und die Agarplatten drei Tage bei 37 °C bebrütet. (B) Das Wachstum drei verschiedener Suppressor Stämme sowie der Kontrollstämme CCB3 und LTB1 wurde auf dem Selektionsmedium getestet, indem eine Verdünnungsreihe (10^0 - 10^{-5}) der Stämme hergestellt und jeweils 5 µl der Verdünnungen auf den Nährboden getropft wurde.

Um zu testen, ob die drei getesteten Suppressor Stämme auch mit anderen kompatiblen Soluten besser wachsen als deren Vaterstamm, wurde ein Osmoprotektionsassay in Flüssigmedium mit 1.2 M NaCl und 0.2 mM kompatiblen Soluten wie in 3.3.2 beschrieben durchgeführt und die OD₅₇₈ nach 17 Stunden gemessen. In Abbildung 14 wird deutlich, dass die drei getesteten Suppressor Stämme LTB3, LTB4 und LTB5 mit allen kompatiblen Soluten auf eine höhere OD₅₇₈ wuchsen als ihr Ausgangsstamm LTB1. Bis auf die Kulturen mit Cholin und Carnitin war die OD₅₇₈ in allen Suppressor Stämmen doppelt so hoch wie die jeweilige Kultur mit dem Stamm LTB1 [46]. Mit den Soluten Cholin und Carnitin war aber ebenfalls erhöhtes Wachstum erkennbar. Allerdings wird aus der Abbildung ersichtlich, dass der Stamm CCB3, der das OpuC System besitzt, mit den kompatiblen Soluten geringfügig besser wachsen kann als die drei Suppressor Stämme (Abbildung 14).

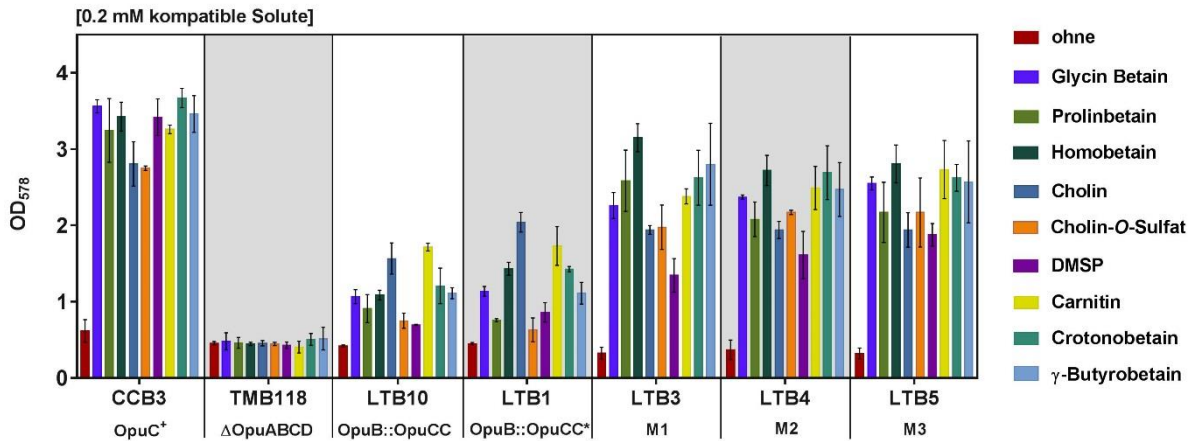


Abbildung 32: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Charakterisierung von Suppressor Stämmen.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 0.2 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt. Der Stamm LTB1 besitzt eine ungewollte Mutation im SBP OpuCC des hybriden ABC Transporters (OpuCCM²¹¹I). Diese liegt am Randbereich des SBP und hat keinerlei Auswirkung auf den Transport der kompatiblen Solute (Abbildung 57, Tabelle 18). Die Mutation wurde mittels gerichteter Mutagenese zum OpuCC_{wt} Protein korrigiert und der Transporter in den Stamm TMB118 integriert, wodurch der Stamm LTB10 entstand. Im Folgenden wird nur noch dieser Stamm verwendet.

Aus den Wachstumsversuchen wurde ersichtlich, dass mit Hilfe des Suppressor Screens Mutanten isoliert werden konnten, die scheinbar durch Mutationen eine verbesserte Transporteffizienz im Vergleich zum Stamm LTB10 (OpuB::OpuCC) erlangt haben. Um herauszufinden in welchem Gen eine Mutation eingebaut wurde, wurde zunächst das hybride Operon *opuB::opuCC* der drei Stämme sequenziert, da vermutet wurde, dass das „Bindeinterface“ von SBP und TMDs oder aber der Translokationsweg nicht perfekt für den Transport von kompatiblen Soluten wie Glycin Betain oder Homobetain ist. Allerdings konnten durch Sequenzierung des ganzen Operons zusätzliche Mutationen ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob der Wachstumsvorteil möglicherweise durch eine erhöhte Menge des Transporters zu Stande kommt, wurde mittels Western Blot das Bindeprotein OpuCC, welches in allen Stämmen und deren Transportern vorhanden ist, detektiert. Die Stämme wurden, wie in 3.3.2 beschrieben, kultiviert und nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 1 wurde 1 ml Kultur entnommen, die Probe für eine SDS-PAGE aufbereitet und anschließend ein Western Blot und eine Immunodetektion mit dem Antikörper α-OpuCC, wie in 3.5.8 beschrieben, durchgeführt. Betrachtet man die ersten beiden Spuren des Blots, auf denen zum einen der OpuC Kontrollstamm CCB3 und zum anderen der Stamm LTB10 (OpuB::OpuCC) aufgetragen wurden, wird deutlich, dass die Menge von OpuCC im Stamm mit dem OpuB::OpuCC Konstrukt deutlich verringert ist im Vergleich zur OpuC Kontrolle (Abbildung 15). Da dieser

Phänotyp reproduzierbar war, ist davon auszugehen, dass im Stamm LTB10 weniger hybride ABC Transporter vorhanden sind als im Stamm CCB3 OpuC Transporter, was den Wachstumsnachteil unter hochosmolaren Bedingungen erklären würde. Die OpuCC-Mengen in den Suppressor Stämmen sind im Vergleich zum LTB10 Ausgangsstamm stark erhöht und sogar geringfügig höher im Vergleich zur OpuC Kontrolle (Abbildung 15) [46]. Dies lässt darauf schließen, dass der Wachstumsvorteil, den die Suppressor Mutanten besitzen, darauf beruht, dass mehr Transporter exprimiert und produziert werden und somit bei Salzstress schneller kompatible Solute in die Zelle gelangen.

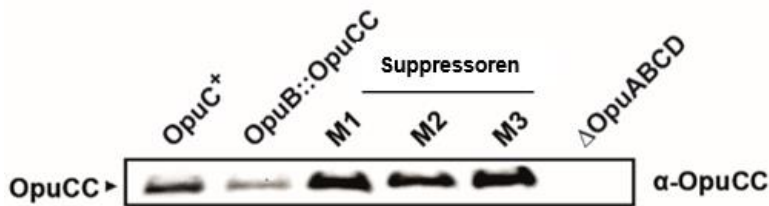


Abbildung 33: Detektion von OpuCC in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion zur Untersuchung der Transportermenge in Suppressor Stämmen.

Die *B. subtilis* Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von 1 kultiviert und die Zellpellets anschließend wie in 3.5.7 beschrieben für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion aufbereitet. Der Antikörper α-OpuCC wurde verwendet, um diese Proteine spezifisch detektieren zu können, da dieser Antikörper nur das SBP OpuCC bindet [37].

Aufgrund dieser Erkenntnisse sind Mutationen im GbsR Repressor des *opuB* Operons denkbar. Ein Repressor, der keine oder eingeschränkte Funktionalität mehr besitzt würde zur erhöhten Expression des Operons *opuB::opuCC* führen. Aufgrund dessen wurde das Gen *gbsR* in den Suppressor Stämmen LTB3, LTB4 und LTB5 sequenziert. In jedem Stamm wurde eine Mutation gefunden, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch im Regulator GbsR führt. Durch den Suppressor Screen konnten Mutanten isoliert werden, die das Operon *opuB::opuCC* durch Mutation des Repressors GbsR dereprimieren und demnach eine erhöhte Menge des Transporters OpuB::OpuCC produziert wird (Abbildung 33) [46]. Die erhöhten Mengen führen dazu, dass osmoprotektive Schutzsubstanzen schneller in die Zelle geraten und die Suppressor Mutanten demnach einen Wachstumsvorteil in hochosmolarem Medium besitzen. Zusätzlich bietet der Suppressor-Screen eine neue und elegante Methode den MarR-Typ Repressor GbsR weiter zu charakterisieren. Die Struktur des Proteins, die Lage der gefundenen Mutationen sowie eine detaillierte Charakterisierung dieser und weiterer Mutanten wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

4.5.2 Erstellung einer Suppressoren Stammsammlung

In Kapitel 4.5.1 wurde ein Suppressor Screen vorgestellt, in dem die Suppressoren einen Wachstumsvorteil auf hochosmolaren Medium mit limitierten Glycin Betain Konzentration erhielten. Es konnten bereits drei der Suppressoren näher analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass alle drei Stämme eine Mutation im *opuB* Repressor GbsR enthielten und diese durch Derepression des *opuB::opuCC* Operons erhöhte Transportermengen besitzen (Abbildung 33). Folglich erhielten die drei Suppressor Stämme einen Wachstumsvorteil gegenüber ihres Vaterstammes (Abbildung 31B, 32), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die jeweilige Mutation im GbsR dazu führt, dass der Repressor seine Funktionalität ganz oder teilweise verliert [46]. In diesem Kapitel sollen die Mutationen der drei bereits vorgestellten Stämme und noch sechs weiterer Suppressor Stämmen näher betrachtet und deren Auswirkungen in Hinblick auf die Osmoprotektion, die Mengen der hybriden OpuB::OpuCC Transporter, die kinetischen Parameter des OpuB::OpuCC Transporters, den Einfluss auf die *gbsA* Expression sowie die DNA-Bindungsfähigkeit analysiert werden. Diese Suppressoranalyse soll durch die eigen eingeführten Mutationen in den MarR-Typ Regulator GbsR dessen Funktionalität und Strukturabhängigkeit des Repressors aufklären.

Insgesamt wurden 50 Suppressor Stämme isoliert, von denen 18 durch die Deletion eines Adenins in eine AT-reiche Region des *gbsR* Gens zu einem frame-shift (Codon 79: ACA → CA) und frühzeitigem Stopp-Codon führten und 20 Mutanten eine Deletion von 253 Basenpaaren immer an der gleichen Stelle besaßen. Diese Deletion ist darauf zurückzuführen, dass sich zwei „Repeats“ von sieben Basenpaaren (AAAGCTT) in der DNA-Sequenz von *gbsR* befindet, sodass es dazu führen kann, dass die Polymerase bei der Replikation durch „Slipped Strand Mismatching“ den Teil innerhalb dieser gleichen Basenabfolge überspringt. Durch die Deletion erhält der Suppressor Stamm dann ein defektes Protein, welches die GbsR-Bindestellen vor *opuB* und *gbsAB* nicht mehr binden und somit die Operone nicht mehr reprimieren kann. In drei Suppressor Stämmen wurde ein Basenaustausch 15 Basenpaare vor dem Start-Codon (ATG) und somit 2 Basenpaare vor der Ribosomenbindestelle des *gbsR* Gens gefunden. In Abbildung 34 ist ein Modell des GbsR Proteins mit den neun Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, dargestellt. Ein Suppressor besaß eine Mutation in der möglichen Cholin Bindebox (blau): F⁹⁹S. Es wurden fünf Mutationen in der flexiblen Linkerregion (orange) gefunden: K⁷⁷N, T⁷⁹A, G⁸³D, R⁸⁵C und R⁸⁵S. Die Position 85 wurde demnach zwei Mal getroffen. Außerdem wurden zwei Mutationen im Winged Helix-Turn-Helix Motiv (grün), welches an die DNA bindet, gefunden: S⁶²N und D⁵⁰Y. Die Mutation G³⁹E liegt in der angrenzenden Helix zum DNA-Bindemotiv, weshalb diese Mutation im Folgenden

ebenfalls zur Kategorie Mutation im DNA-Bindemotiv gezählt wird. Die Mutanten aus Kapitel 4.1.3 [LTB3 (G³⁹E), LTB4 (T⁷⁹A) und LTB5 (R⁸⁵S)] ebenfalls charakterisiert.

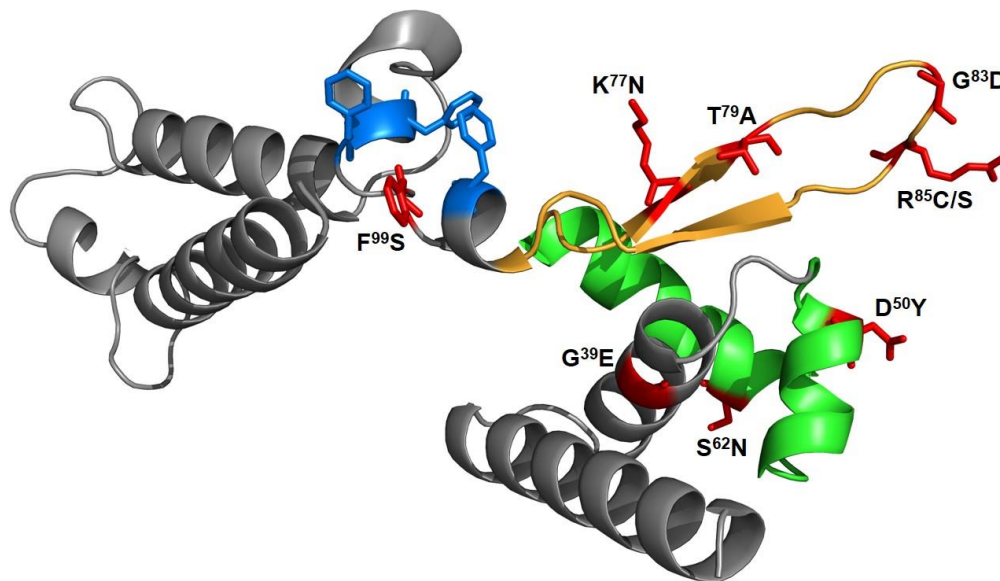


Abbildung 34: Monomer des *in-silico* Modells des Repressors GbsR aus *B. subtilis* mit Suppressor Mutationen.

Das *in-silico* Modell wurde mit dem Webserver SWISS-Model [133] auf Grundlage der Struktur des Proteins Mj223 (PDB: 1ku9) aus *M. jannaschii* errechnet [38, 87]. Die vorhergesagte Bindetasche für Cholin, bestehend aus vier Phenylalaninen, ist in blau dargestellt. Das Winged Helix-Turn-Helix Motiv, welche die DNA-Bindung ermöglicht ist grün markiert. In orange wurde die bewegliche Linkerdomäne dargestellt. Rot markiert wurden die Aminosäuren, die durch eine andere Aminosäure durch einen Basenaustausch ersetzt wurden.

4.5.3 Wachstumsvorteil der Suppressoren unter hyperosmotischen Bedingungen

Zunächst wurden die neun Suppressor Stämme mit den einzelnen Aminosäureaustauschen, eine $\Delta 253$ bp Mutante (hervorgehend aus dem „Repeat“), eine ΔA -Mutante (Deletion einer Base, die zum frühzeitigem Stopp-Codon führt) und eine Mutante aus der „RBS-Region“ (2 Basenpaare vor der Ribosomenbindestelle von *gbsR*) physiologisch untersucht, um zu prüfen, ob es ein Wachstumsvorteil gegenüber des Vaterstammes LTB10 gibt. Die Durchführung des Experimentes kann Kapitel 4.1.3 entnommen werden. Die physiologischen Untersuchungen wurden von Michelle Aillaud im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit durchgeführt [143]. Zusätzlich zu den zu testenden Mutanten wurden jeweils der Vaterstamm LTB10 (OpuB::OpuCC) und eine positive Wachstumskontrolle (OpuB::OpuCC GbsR⁻) auf hochosmolarem Medium (1.1. M NaCl) mit 50 μ M Glycin Betain in verschiedenen Verdünnungsstufen getropft und drei Tage bei 37°C inkubiert. Der Vaterstamm (orange) war durch die verringerte Transportermenge nur in der Lage bis zur Verdünnungsstufe 10^{-1} Wachstum zu zeigen. Wurde im Vaterstamm der *opuB* Repressor GbsR deletiert

(OpuB::OpuCC GbsR⁻) konnte dieser Stamm bis zur Verdünnungsstufe 10^{-4} auf dem hochosmolaren Medium wachsen (blau). Die Menge des hochaffinen hybriden ABC Transporters scheint durch die Derepression gestiegen zu sein, sodass die osmoprotektiven Eigenschaften dieses Stammes verbessert wurden. Betrachtet man das Wachstum der 12 Suppressor Stämme (grün) so wird deutlich, dass alle besser wachsen als der Vaterstamm (orange) (Abbildung 35). Mit Ausnahme der Mutante GbsR-G⁸³D zeigten alle Suppressoren Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} . Sieben der 12 Mutanten erreichten Wachstum bis zu Verdünnungsstufe 10^{-4} , zeigten also den gleichen Wachstumsphänotyp wie die positive Wachstumskontrolle (OpuB::OpuCC GbsR⁻, blau) [143]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Suppressor Mutanten einen Wachstumsvorteil auf hochosmolarem Medium mit limitierten Glycin Betain Konzentrationen gegenüber ihres Vaterstammes LTB10 durch mutieren des Repressors GbsR erlangt haben. Es scheint hierbei keine große Rolle zu spielen, ob sich die Mutation in der Cholin-Bindebox, der Linkerregion oder im DNA-Bindemotiv befindet.

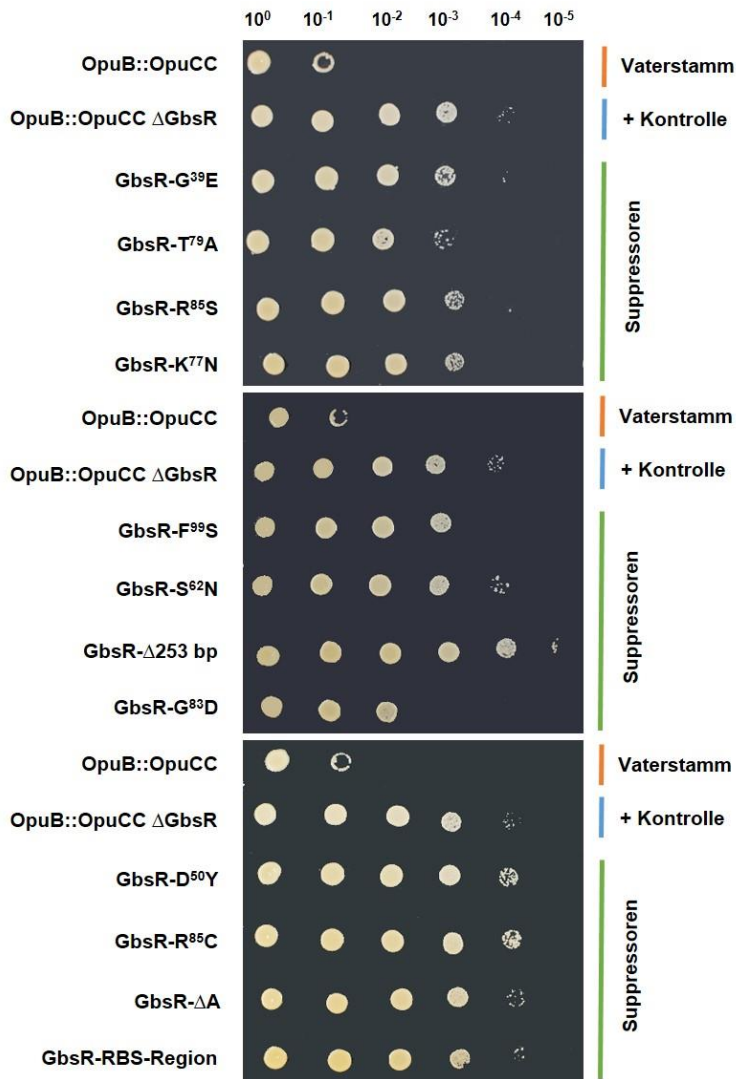


Abbildung 35: Wachstumsanalyse der Suppressor Mutanten im Vergleich zum Vaterstamm.

Das Wachstum der zwölf Suppressor Stämme (grün) sowie der Kontrollstämme (orange, blau) wurde auf hochosmolarem Medium mit limitierenden Glycin Betain Konzentrationen (1.1 M NaCl, 50 μ M Glycin Betain) getestet, indem eine Verdünnungsreihe (10^0 - 10^{-5}) der Stämme hergestellt und jeweils 5 μ l der Verdünnungen auf den Nährboden getropft wurde. Der Wachstumsversuch wurde mit jeweils drei unabhängigen Parallelen durchgeführt.

Um zu zeigen, dass die Verbesserung des osmotischen Schutzes der Suppressor Stämme auf eine erhöhte Menge des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC zurückzuführen ist, wurde von Michelle Aillaud mittels Western Blot und Immunodetektion, wie in 4.1.3 beschrieben, das SBP OpuCC in den Suppressor Stämmen nachgewiesen. Es konnte wieder gezeigt werden, dass die Menge von OpuCC im Stamm mit dem OpuB::OpuCC Konstrukt (orange) deutlich verringert ist im Vergleich zur OpuC Kontrolle. Als zusätzliche Kontrolle wurde der Stamm ohne die Opu-Transporter, welche keine Bande zeigt, und der Vaterdamm mit GbsR Deletion aufgetragen (blau), welcher eine stärkere Bande im Vergleich zum Vaterstamm ohne GbsR Deletion (orange) aufweist (Abbildung 36). Die OpuCC-Mengen in den Suppressor Stämmen

(grün) sind im Vergleich zum Vaterstamm (orange) stark erhöht und sogar geringfügig mehr im Vergleich zur OpuC Kontrolle (Abbildung 36) [143]. Dies lässt darauf schließen, dass der Wachstumsvorteil, den die Suppressor Mutanten besitzen, darauf beruht, dass mehr hybride OpuB::OpuCC ABC Transporter produziert werden und somit bei Salzstress schneller kompatible Solute in die Zelle gelangen.

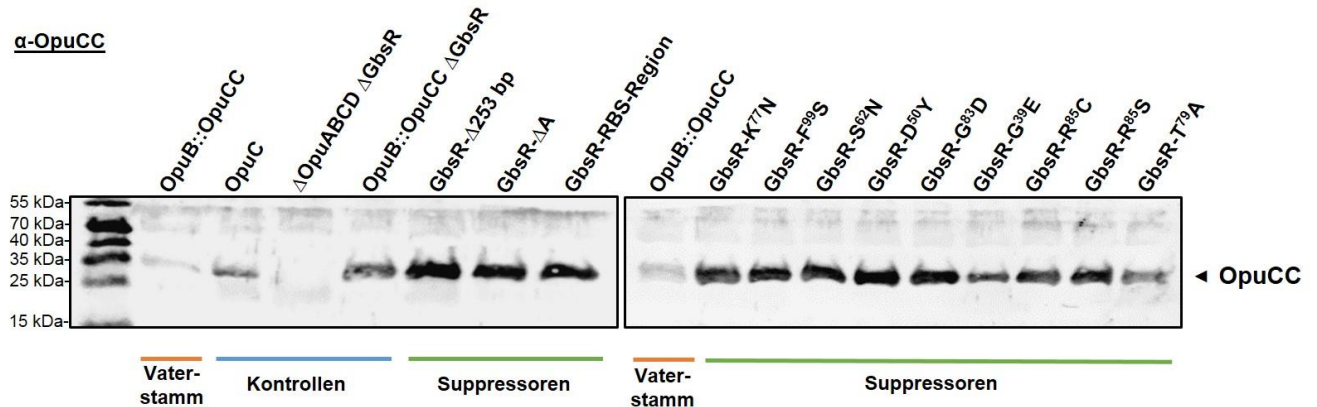


Abbildung 36: Detektion von OpuCC in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen mittels Western Blot und Immunodetektion zur Untersuchung der Transportermenge in Suppressor Stämmen.

Die *B. subtilis* Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von 1 kultiviert und die Zellpellets anschließend wie in 3.5.7 beschrieben für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion aufbereitet. Der Antikörper α -OpuCC wurde verwendet, um diese Proteine spezifisch detektieren zu können, da dieser Antikörper nur das SBP OpuCC bindet. Auf beiden Blots wurde zusätzlich zu den zu analysierenden Suppressor Stämmen (grün) der Vaterstamm dieser Mutanten (orange) aufgetragen.

4.5.4 Steigerung der maximalen Transportgeschwindigkeit

Der effizientere Transport von Glycin Betain als Osmoprotektivum bei Salzstress über den hybriden ABC-Transporter OpuB::OpuCC kann durch Ermittlung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) mit Hilfe von radioaktiv markiertem [1-¹⁴C]-Glycin Betain analysiert werden. Hierfür wurden von mir repräsentativ die Suppressoren mit folgenden Mutationen analysiert: GbsR-R⁸⁵S und GbsR-G⁸³D (flexibler Linker), GbsR-D⁵⁰Y und GbsR-S⁶²N (DNA-Bindemotiv) und GbsR-F⁹⁹S (mögliche Cholin-Bindebox). Da diese Suppressor Stämme [LTB5 (GbsR-R⁸⁵S), LTB59 (GbsR-G⁸³D), LTB60 (GbsR-D⁵⁰Y), LTB57 (GbsR-S⁶²N) und LTB56 (GbsR-F⁹⁹S)] alle das hybride Transportsystem OpuB::OpuCC im Genlokus *amyE* tragen, wurde als Kontrolle der Stamm CCB3 gewählt, da dieser das *opuC* Operon ebenfalls im *amyE* Gen integriert hat. Der OpuC ABC-Transporter besitzt eine V_{\max} von 100 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹, während der hybride Transporter OpuB::OpuCC im Vaterstamm LTB10 (GbsR⁺) einen fünffach schlechteren V_{\max} Wert von 20 nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ besitzt (Tabelle 13, 16) [48]. Da sich dieser Wert nicht auf den einzelnen Transporter, sondern auf die

gesamten Proteine bezieht, kann davon ausgegangen werden, dass nicht der hybride ABC Transporter selbst ineffizient ist, sondern dass die geringere Transportermenge (Abbildung 15, 36) hierfür verantwortlich ist. Die Affinität (K_m -Wert) der beiden Transportsysteme ist mit 5 und 6 μM nahezu identisch (Tabelle 16). Beide Transporter scheinen dadurch, dass sie mit demselben SBP OpuCC ausgestattet sind, eine sehr hohe Affinität zu Glycin Betain zu haben. Betrachtet man die K_m -Werte der hybriden ABC Transporter der Suppressor Stämme ist nicht verwunderlich, dass auch diese mit Werten von 5-14 μM ebenfalls eine hohe Affinität zu Glycin Betain besitzen. Einzig in der maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{\max}) unterscheiden sich die Suppressor Stämme zum Vaterstamm. Obwohl sich in der Zelle der gleiche hybride ABC Transporter befindet, erreichen alle getesteten Suppressoren eine V_{\max} von 94-108 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Die Geschwindigkeit, mit der Glycin Betain in die Zelle gelangt ist also im Vergleich zum Vaterstamm fünffach schneller und somit genau so effizient wie das OpuC Wildtyp System.

Tabelle 16: Kinetische Parameter der ABC Transporter OpuB und OpuB::OpuCC in verschiedenen *B. subtilis* Stämmen.

	Transporter	Mutation	Region der Mutation	V_{\max} (nmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)
Kontrollstamm	OpuC	-	-	100 ± 5	5 ± 1
Vaterstamm	OpuB::OpuCC	GbsR_{wt}	-	20 ± 1	6 ± 1
Suppressor	OpuB::OpuCC	GbsR-R⁸⁵S	Linker	95 ± 4	14 ± 2
Suppressor	OpuB::OpuCC	GbsR-G⁸³D	Linker	95 ± 3	5 ± 1
Suppressor	OpuB::OpuCC	GbsR-D⁵⁰Y	DNA-Bindemotiv	94 ± 3	5 ± 1
Suppressor	OpuB::OpuCC	GbsR-S⁶²N	DNA-Bindemotiv	95 ± 3	5 ± 1
Suppressor	OpuB::OpuCC	GbsR-F⁹⁹S	Cholin-Bindebox	108 ± 4	6 ± 1

Die Michaelis-Menten Kurven sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 68).

Die Hypothese, dass der Wachstumsvorteil der Suppressor Mutanten darauf beruht, dass mehr hybride ABC Transporter produziert werden und somit bei Salzstress schneller kompatible Solute in die Zelle gelangen, konnte durch die Bestimmung der maximalen Transportgeschwindigkeit bezogen auf die gesamte Proteinmenge bestätigt werden. Die eingeführten Mutationen in den *opuB* Repressor GbsR führt in allen Fällen zu einer Derepression des *opuB* Operons. Es konnten keine Unterschiede zwischen Mutationen im flexiblen Linker, im DNA-Bindemotiv oder in der möglichen Cholin-Bindetasche festgestellt werden, sodass davon ausgegangen wird, dass alle Mutationen zu einer

Konformationsänderung des Proteins führen, welche es verhindert, dass das GbsR Repressor Protein weiter an den Promotorbereich von *opuB* bzw. *gbsAB* binden kann.

4.5.5 Einfluss der Mutationen auf die DNA-Bindung

Die Bindung des Repressors GbsR an die DNA kann mit Hilfe eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) analysiert werden. Hierbei zeigt der Protein-DNA-Komplex ein anderes Laufverhalten in einem elektrophoretisch aufgetrennten Gel als ungebundene DNA. In vorläufigen EMSA Experimenten durch Oppen (2009) konnte bereits gezeigt werden, dass GbsR sowohl in der Promotorregion vor dem *gbsAB* Operon, als auch vor dem *opuB* Operon bindet [144]. Um die DNA-Bindeeigenschaften der GbsR Suppressor Mutanten mit dem des GbsR Wildtyp Proteins vergleichen zu können, wurde alle Proteine heterolog exprimiert (3.5.5) und über Strep-Tag® Affinitätschromatographie gereinigt (3.5.6). Hierfür wurden die Plasmide pSTH02 (GbsR_{wt}), pLT22 (GbsR-R⁸⁵S), pLT25 (GbsR-G⁸³D), pLT27 (GbsR-D⁵⁰Y), pLT24 (GbsR-S⁶²N) und pLT26 (GbsR-F⁹⁹S) in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Als DNA Fragment diente ein 96 bp langes PCR-Fragment, welches die GbsR-Bindestelle vor *gbsA* einschließt. Als Kontrollfragment, auf dem der Repressor nicht binden kann, wurde ein 98 bp langes Fragment im *gbsA* Gen verwendet [59]. Die EMSA Läufe wurden stets unmittelbar nach Reinigung der Proteine durchgeführt. Abbildung 37A zeigt das Laufverhalten des GbsR_{wt}-DNA-Komplexes. Im linken Experiment wurde das Fragment mit der GbsR Bindestelle vor *gbsA* verwendet. Es wird sichtbar, dass das Protein mit der GbsR Bindestelle interagiert und die Bande oberhalb der freien DNA sichtbar wird. Der Komplex ist größer und läuft dementsprechend langsamer durch das Gel. Bereits ab einem fünffachen Überschuss von GbsR zu DNA wird die obere Bande sichtbar. Bei 50-fachem Überschuss ist keine Bande für die freie DNA mehr zu sehen, was darauf hindeutet, dass die Proteine die DNA vollständig gebunden haben. Im rechten Experiment (Abbildung 37A) wurde das Kontrollfragment ohne GbsR Bindestelle genutzt. Wie erwartet konnte keine Bindung stattfinden, weshalb keine erhöhte Bande eines Protein-DNA-Komplexes sichtbar wird. Von den Mutanten wurden wieder repräsentativ folgende auf die Bindung auf die GbsR Bindestelle vor *gbsA* untersucht: GbsR-R⁸⁵S und GbsR-G⁸³D [(flexibler Linker) Abbildung 37 B], GbsR-D⁵⁰Y und GbsR-S⁶²N [(DNA-Bindemotiv) Abbildung 37 C)] und GbsR-F⁹⁹S [(mögliche Cholin-Bindebox) Abbildung 37 D)]. Als Negativ-Kontrolle (-) wurde jeweils das Kontrollfragment im *gbsA* mit 100-fachem Überschuss des mutierten GbsR Proteins und als Positiv-Kontrolle das Fragment mit GbsR Bindestelle und 100-fachem Überschuss von GbsR_{wt} verwendet. Die Proteine mit den Mutationen im Linker (B) GbsR-R⁸⁵S und GbsR-G⁸³D zeigten nahezu keine Bindung zur

Bindestelle vor *gbsA*. Das Protein GbsR-R⁸⁵S zeigt ab 50-fachem Protein-Überschuss eine sehr schwach erhöhte und verschmierte Bande im Vergleich zur ungebundenen DNA. Beim Protein GbsR-G⁸³D ist diese verschmierte Bande erst nach 50-fachem Protein-Überschuss sichtbar. Die Banden befinden sich allerdings längst nicht auf der Höhe des GbsR_{wt}-DNA-Komplexes. Da aber das Wildtyp GbsR bereits nach 50-fachem Überschuss eine vollständige Bindung der DNA zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass beide Mutationen im Linker dazu führen, dass nur noch eine sehr schlechte Bindung zur Bindestelle vor *gbsA* möglich ist. Betrachtet man die DNA-Bindung der beiden Mutanten, in denen sich die Mutationen im DNA-Bindemotiv befinden, wird deutlich, dass diese beiden Proteine (GbsR-D⁵⁰Y und GbsR-S⁶²N) ab einem Protein-DNA-Überschuss von 50 eine erhöhte Bande auf Höhe des GbsR_{wt}-DNA-Komplexes zeigen. Allerdings ist gleichzeitig noch eine stark sichtbare Bande auf der Höhe der ungebundenen DNA zu sehen, was darauf hinweist, dass nur ein kleiner Teil des DNA-Fragments von den Proteinen gebunden wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutanten GbsR-D⁵⁰Y und GbsR-S⁶²N eine bessere Bindung zur DNA aufweisen als die beiden anderen untersuchten Mutanten, in denen sich die Mutationen im flexiblen Linker von GbsR befinden. Dies war nicht vorherzusehen, da sich die Mutationen D⁵⁰Y und S⁶²N in direkter Lage des DNA-Lesekopfes befinden. Eine Mutation in der möglichen Cholin-Bindebox (GbsR-F⁹⁹S, Abbildung 37 D) führt dazu, dass das Protein nicht mehr in der Lage ist die Bindestelle vor *gbsA* zu binden. Es kann keine erhöhte Bande detektiert werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Mutation zu einer Konformationsänderung führt, sodass der GbsR-Monomer entweder keinen Dimer mehr bilden kann, oder dass die DNA-Leseköpfe des Dimers nicht mehr in der Lage sind eine Interaktion mit der DNA einzugehen. Die Proteine zeigen keinerlei Bindung mehr zur GbsR-Bindestelle vor *gbsA*. Eine Überprüfung, ob die GbsR Mutanten richtig gefaltet und als Dimere vorliegen muss allerdings noch durch Gelfiltration oder CD-Spektroskopie erfolgen.

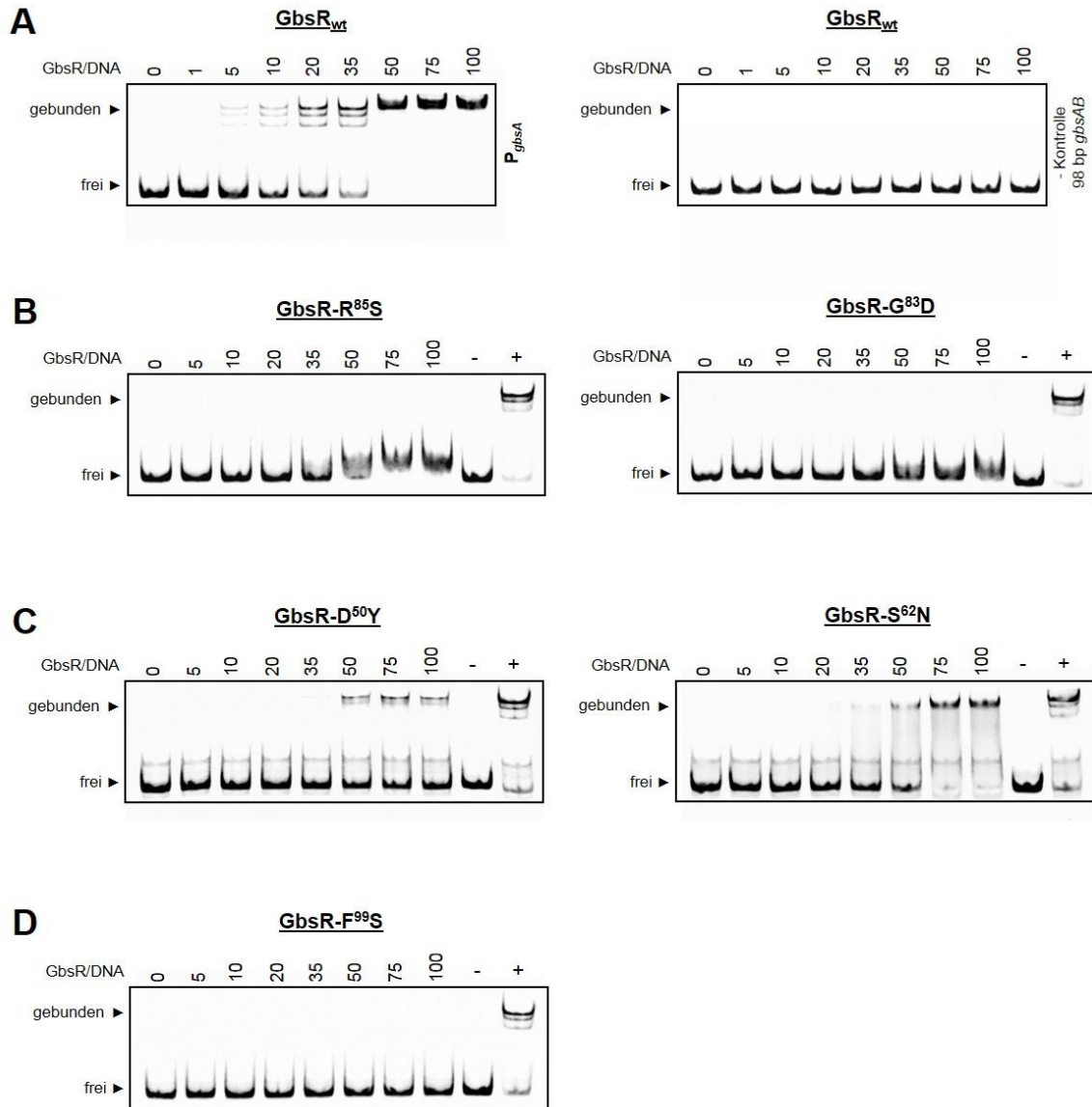


Abbildung 37: EMSA mit der *gbsA* Promotor- sowie Binderegion und verschiedenen GbsR-Mutanten.

1 pmol des fluoreszenzmarkierten 96 bp großen DNA-Fragments (P_{gbsA}) wurde mit verschiedenen Mengen des frisch gereinigten GbsR Proteins (5-100-facher molarer Überschuss) inkubiert und die DNA:GbsR Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Links wurde das GbsR_{wt} Protein und das P_{gbsA} Fragment verwendet. Rechts wurde das GbsR_{wt} Protein und ein 98 bp großes Kontrollfragment im *gbsA* Gen verwendet. Ausgewählt wurden jeweils zwei GbsR Suppressor Mutanten, die sich im flexiblen Linker (B) und im DNA-Bindemotiv (C) befinden. (D) zeigt die Mutation, die sich in der putativen Cholin-Bindebox befindet. In allen EMSA Experimenten der getesteten mutierten GbsR Proteine wurde parallel das GbsR_{wt} Protein gereinigt und ebenfalls mit dem P_{gbsA} Fragment inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt (+) Hierbei wurde ein 100-facher Überschuss (DNA:GbsR_{wt}) gewählt. Als Negativkontrolle diente für jedes EMSA Experiment die jeweilige GbsR Mutante zusammen mit dem Kontrollfragment aus dem Gen *gbsA*, auf welchem keine Bindung möglich ist. Alle Proteine wurden auf einer SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft. Es war stets eine sehr schwache Abbaubande sichtbar, die sich in allen Proteinen gleich verhielt.

4.5.6 Einfluss der Suppressor Mutationen auf die *gbsAB*-Expression

Der Einfluss der Mutationen in GbsR auf die *gbsA* Expression und somit die Funktionalität von GbsR als Repressor kann zusätzlich mittels einer *gbsA-treA* Reporterfusion analysiert werden. Die Konstruktion der *Bacillus* Stämme sowie die Messung der TreA-Aktivität wurden von Michelle Aillaud im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit, wie in 3.5.2 beschrieben, durchgeführt [143]. Die Suppressor Mutationen wurden in ein Plasmid eingebracht, welches das *gbsR* und die *gbsA-treA* Reporterfusion trägt (pGNB13, Tabelle 8). Die entstandenen Plasmide wurden in einen Stamm eingebracht, welcher kein chromosomales *gbsR* und *treA* mehr besitzt (STHB53, Tabelle 7). Nau-Wagner *et al.* konnten bereits zeigen, dass GbsR ein Cholin-sensitiver Repressor für *gbsAB* ist, weshalb das Expressionslevel zum einen ohne Salz und Cholin (vor Induktion, grau) und zum anderen 90 Minuten nach der Zugabe von 0.4 M NaCl und 1 mM Cholin (nach Induktion, rot) geprüft wurde. In Anwesenheit von GbsR liegt uninduziert, also in Abwesenheit vom Induktor Cholin, eine sehr geringe Expression von *gbsA* vor (Abbildung 38). Es sind lediglich Basalaktivitäten messbar (6 Units/mg Protein), da GbsR als „Road-Block“ an die GbsR Bindestelle vor *gbsA* bindet und somit die Expression verhindert. Wird Cholin zugegeben und dieses durch die Salzinduktion von *opuB* und *opuC* auch in die Zelle transportiert, so bindet Cholin an GbsR und durch eine Konformationsänderung kommt es zur Ablösung des Repressors von der DNA. Eine TreA-Aktivität von 169 Units/mg Protein konnte gemessen werden (Abbildung 38). In Abwesenheit von GbsR kann *gbsA* nicht reprimiert werden, sodass in beiden Fällen eine deutliche und gleich starke Expression von 236 bzw. 251 Units/mg Protein vorhanden war (Abbildung 38) [143]. Die publizierten Ergebnisse aus Nau-Wagner *et al.* [38] konnten demnach reproduziert werden. Die GbsR-ΔA Mutante besitzt durch die Deletion einer Base ein Frame-Shift (Codon 79: ACA → CA) und dadurch ein frühzeitiges Stopp-Codon. Das Protein GbsR liegt also nicht mehr in seiner Wildtypsequenz vor und hat demnach auch keine reprimierenden Eigenschaften mehr. Vor und nach Induktion liegt das Expressionslevel auf dem gleichen Niveau wie in der GbsR⁻-Mutante. Gleiches Expressionsmuster ist in der Mutante, welche nahe der Ribosomenbindestelle mutiert wurde, zu sehen (Abbildung 38). Scheinbar kann das Ribosom trotz intakter Ribosomenbindestelle nicht mehr effizient die mRNA binden und das GbsR Protein somit nur ineffizient translatiert werden. Ebenfalls ein GbsR⁻-Phänotyp zeigt zwei Mutationen in der Linkerregion von GbsR. GbsR-K⁷⁷N und GbsR-G⁸³D scheinen ihren Einfluss der Repression von *gbsA* vollständig verloren zu haben da die TreA-Aktivität nach der Induktion auf demselben Niveau ist wie vor der Induktion (Abbildung 38). Die drei weiteren Mutationen im Linker von GbsR (GbsR-T⁷⁹A, GbsR-R⁸⁵S und GbsR-R⁸⁵C) haben

allerdings einen anderen Phänotyp. Die Expression von *gbsA* ist in Abwesenheit von Cholin nicht auf dem Niveau einer GbsR⁻-Mutante, sondern liegt bei etwa 36-48 Units/mg Protein. Diese Werte sind allerdings im Vergleich zum Wildtyp Protein etwa achtfach höher [143]. Hieraus kann also geschlossen werden, dass die Mutationen die DNA scheinbar schlechter binden können als GbsR_{wt}, aber eine Repression von *gbsA* teilweise immer noch möglich ist, was mit den EMSA Daten übereinstimmt (Abbildung 37). Die zwei Mutationen im DNA-Bindemotiv GbsR-S⁶²N und GbsR-D⁵⁰Y besitzen ein unterschiedliches Expressionsprofil. Während die Mutante GbsR-S⁶²N nur eine geringfügig erhöhte Expression ohne Induktor Cholin im Vergleich zum Wildtyp besitzt, zeigt die Mutante GbsR-D⁵⁰Y keinerlei Expression (Abbildung 38), weder im uninduzierten noch im induzierten Zustand. Dieses Ergebnis würde eine Repression bedeuten, die in Anwesenheit vom Induktor Cholin weiterhin besteht. Durch DNA-Bindestudien und Western Blot Analysen konnte für diese Mutante allerdings gezeigt werden, dass das Protein im Vergleich zum Wildtyp GbsR Protein eine eingeschränkte DNA-Bindung besitzt und dadurch erhöhte Transportermengen detektierbar waren. Um die *gbsA* Expression zu verifizieren, sollten die Reportergerienstudien für diese Mutation wiederholt werden, da die EMSA- und Reporterfusionexperimente widersprüchliche Aussagen liefern. Die Mutation GbsR-G³⁹E, welche sich in unmittelbarer Nähe des DNA-Lesekopfes befindet, sowie die Mutation GbsR-F⁹⁹S in der möglichen Cholin-Bindebox zeigen beide wieder einen GbsR⁻-Phänotyp (Abbildung 38). Vor und nach der Induktion ist das Expressionslevel gleich hoch bei etwa 254 bzw. 277 Units/mg Protein, was dafürspricht, dass keine Repression von *gbsA* und demnach keine Bindung an die Bindestelle mehr möglich ist. Die Mutante mit der Mutation GbsR-F⁹⁹S zeigte schon in den EMSA Studien keine DNA-Bindung mehr (Abbildung 37 D), sodass diese Daten die Hypothese unterstützen, dass die Mutation zu einer erheblichen Veränderung der Konformation des Proteins führt, sodass der DNA-Lesekopf topologisch nicht mehr auf die DNA passt.

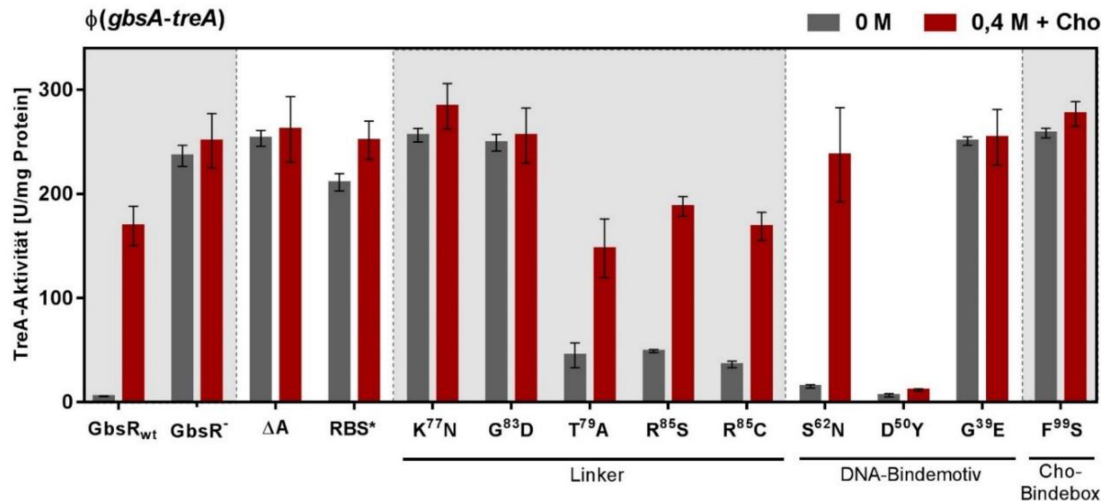


Abbildung 38: Genetische Kontrolle der *gbsA*-Expression in An- und Abwesenheit von Cholin unter Einfluss von GbsR-Suppressor Mutanten.

Die verschiedenen *B. subtilis* Stämme mit verschiedenen GbsR Mutationen wurden in SMM bei 37 °C im Wasserbad kultiviert und Proben bei einer OD₅₇₈ von 0,25 geerntet (grau). Selbige Kulturen wurden mit NaCl (Endkonzentration 0,4 M) und Cholin (Endkonzentration 1 mM) versetzt und nach 90 Minuten Inkubation geerntet (rot). GbsR_{wt} (GNB51) und GbsR⁻ (GNB48) dienten als Kontrollen. Ob sich die Mutationen im flexiblen Linkerbereich von GbsR, im DNA-Bindemotiv oder in der putativen Cholin Bindebox befanden, ist den Balken mit zugehörigen Beschriftungen zu entnehmen. Da alle Proben in einem Experiment vermessen wurden, können die *gbsA-treA*-Aktivitäten miteinander verglichen werden. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung, die aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen resultiert.

4.6 Homocholin – ein neues Osmostressprotektivum für *B. subtilis*

Das Substrat Homocholin ist ein Derivat des natürlich vorkommenden kompatiblen Soluts Cholin. Es besitzt lediglich eine CH₂-Gruppe mehr in der Kohlenstoffkette und ist demnach eine nur sehr geringfügig abweichende chemische Substanz. Im Gegensatz zu Cholin kommt Homocholin allerdings nur sehr selten in der Natur vor, wo es von Bakterien als C-Quelle verwertet werden kann [145] und findet vor allem in medizinischen Forschung Verwendung [145-149]. Es stellt sich nun die Frage ob Homocholin, dadurch dass es eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum in der Natur weit verbreiteten Cholin besitzt, in die *B. subtilis* Zelle aufgenommen werden kann und ob hierbei ebenfalls die ABC-Transporter OpuB und OpuC eine Rolle spielen (Abbildung 39). Außerdem soll analysiert werden, ob Homocholin dann in der Zelle auch über die beiden Dehydrogenasen GbsB und GbsA zu einem Substrat oxidiert wird, welches osmoprotektive Eigenschaften besitzt. Eine logische Möglichkeit wäre die Synthese zu Homobetain. Hier stellt sich die Frage, ob Cholin ebenfalls als Induktor für den *opuB* und *gbsAB* Repressor GbsR fungiert (Abbildung 39).

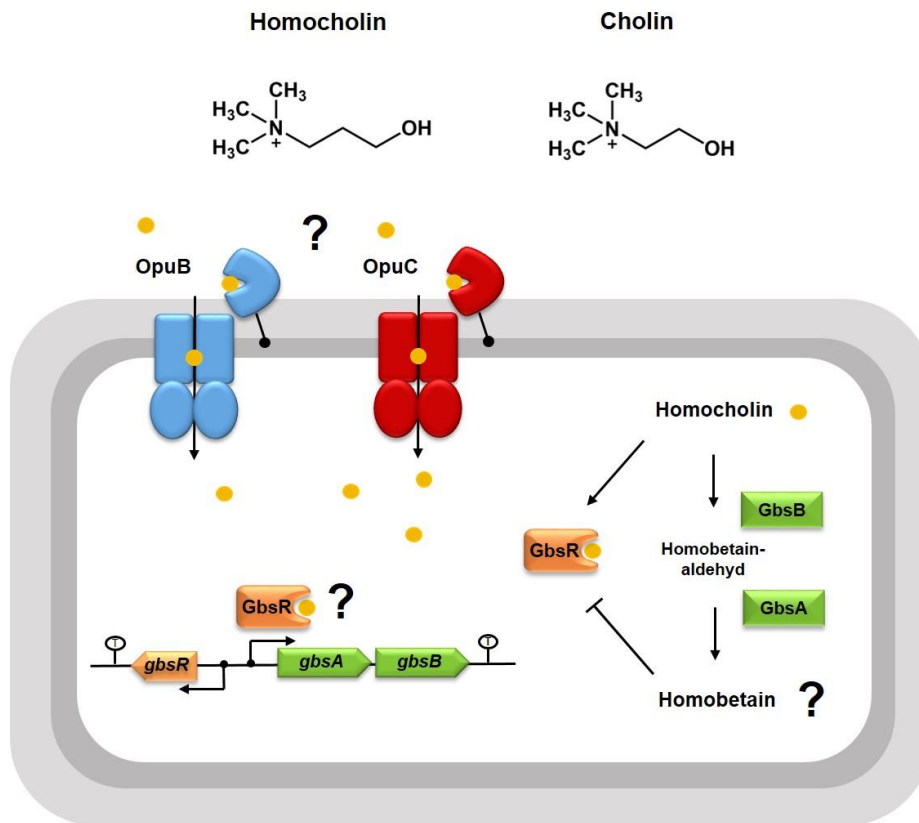


Abbildung 39: Schematische Darstellung und Hypothese über die osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.

Die Abbildung zeigt schematisch eine *B. subtilis* Zelle mit den beiden ABC Transportern OpuB und OpuC, die möglicherweise den Transport des Cholin-Derivats Homocholin (gelber Punkt) in die Zelle vermitteln. Homocholin könnte dort, genau wie Cholin, an den *gbsAB* Repressor GbsR binden, um diesen von der Promotorregion von *gbsAB* zu lösen. Homocholin könnte dann über die Dehydrogenasen GbsB und GbsA in zwei Schritten zu Homobetain oxidiert werden, welches osmoprotektive Eigenschaften besitzt und die Zelle vor Salzstress schützen könnte. Fragezeichen verdeutlichen welche Schritte bei dieser Hypothese unklar sind und analysiert werden müssen.

4.6.1 OpuB und OpuC vermitteln den Transport von Homocholin

Um zu überprüfen, ob das Substrat Homocholin von *B. subtilis* aufgenommen werden kann, wurde ein Osmoprotektionsassay bei Hochsalz (SMM 1.2 M NaCl) durchgeführt und verschiedene *B. subtilis* Stämme in An- und Abwesenheit von 1 mM kompatibler Solute, unter anderem auch das Cholin-Derivat Homocholin, kultiviert. Es wurden Stämme genutzt, in denen jeweils nur ein Opu-Transporter vorhanden war. Als Kontrollstämme wurde der Wildtyp und der Stamm TMB118, der keine Opu-Transporter außer den Prolin-Transporter OpuE mehr besitzt, genutzt. In allen folgenden Experimenten wurden als Kontrollen stets die kompatiblen Solute Cholin und Glycin Betain genutzt, da Cholin eine sehr ähnliche Struktur hat wie Homocholin und Cholin in *B. subtilis* zu Glycin Betain umgewandelt werden muss, um die Zelle vor Salzstress zu schützen. Homobetain wurde ebenfalls verwendet, da die Hypothese aufgestellt wurde, dass aus Homocholin Homobetain synthetisiert wird, um osmoprotektiv zu

wirken. In Abbildung 40 ist das Wachstum der oben genannten Stämme mit den jeweiligen kompatiblen Soluten bei Hochsalz dargestellt. Der Wildtyp Stamm JH642 konnte mit Hilfe der Opu-Transporter nur Glycin Betain, Homobetain und Cholin als Osmoprotektivum nutzen. Mit Homocholin war nur ein Wachstum bis auf eine OD₅₇₈ von etwa 0.9 möglich, was keinem osmoprotektiven Wachstum entspricht, da der Stamm auch ohne kompatible Solute auf diese OD₅₇₈ wachsen konnte. Der Stamm TMB118 konnte mit keinem der getesteten Substrate wachsen, da dem Stamm die Opu Transporter OpuA, OpuB, OpuC und OpuD fehlen. Da schon mit dem Wildtyp, der all diese Transportsysteme besitzt kein Wachstum mit Homocholin möglich war, war zu erwarten, dass die weiteren Stämme ebenfalls kein Wachstum aufwiesen. Sie konnten nur auf eine OD₅₇₈ von 0.3-0.9 wachsen (Abbildung 40). Glycin Betain wirkte im Stamm SBB1 (OpuA⁺), SBB2 (OpuC⁺) und SBB3 (OpuD⁺) osmoprotektiv, woraus geschlossen werden kann, dass diese Transporter Glycin Betain in die Zelle schleusen. Ein protektives Wachstum mit Homobetain war nur in den Stämmen SBB1 (OpuA⁺) und SBB2 (OpuC⁺) möglich. Allerdings wurde nur eine OD₅₇₈ von etwa 1.9-2.2 erreicht, wobei Kulturen mit Glycin Betain OD₅₇₈ zwischen 2.5 und 2.8 erreichten (Abbildung 40). Homobetain wird demnach über die beiden ABC Transporter OpuA und OpuC aufgenommen. Ein Wachstum mit Cholin war mit dem Stämmen SBB5 (OpuB⁺) und SBB2 (OpuC⁺) möglich, was den Erwartungen entspricht, da der ABC Transporter OpuB ein hochspezifischer Cholintransporter ist und das OpuC System ebenfalls Cholin transportieren kann.

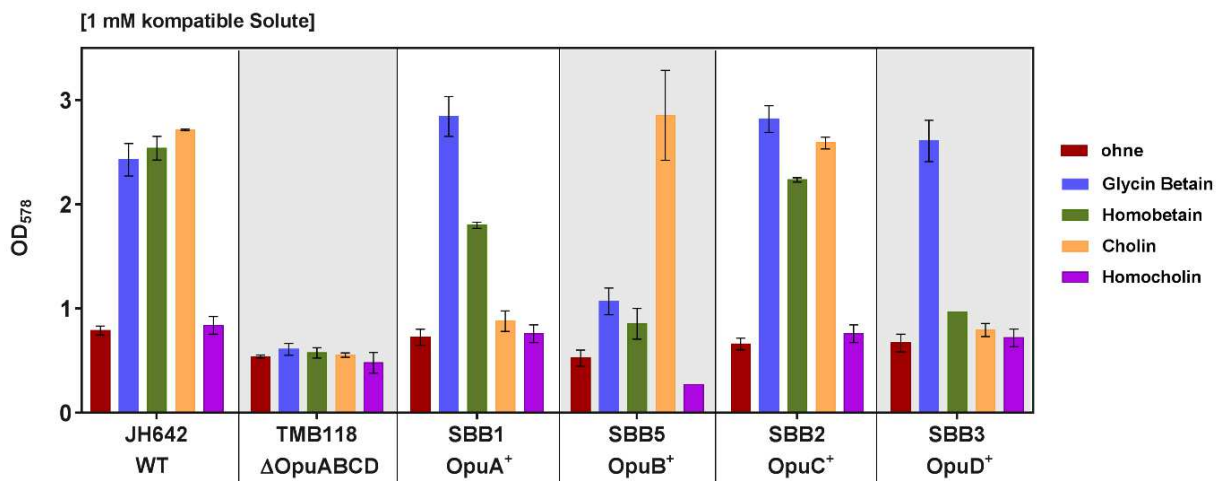


Abbildung 40: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass Homocholin entweder durch keinen der Opu Transporter in die Zelle von *B. subtilis* geschleust werden kann oder aber, dass es in die Zelle gelangt, dort aber selbst keine osmoprotektiven Eigenschaften besitzt, da keine anschließende Synthese zum möglichen kompatiblen Solut Homobetain stattfindet und folglich kein Wachstum sichtbar ist. Um zu testen, ob GbsR hierbei eine Rolle spielt, da durch die Repression von *gbsAB* diese Umwandlung nicht möglich wäre, wurde in den oben getesteten Opu-Einzelmutanten Stämmen (SBB1, SBB5, SBB2 und SBB3) jeweils das Gen *gbsR* deletiert (LTB23, LTB26, LTB24 und LTB25) und der Wachstumsversuch unter gleichen Bedingungen wiederholt. Es wurden wieder die beiden Stämme JH642 und TMB118 als Kontrolle mit kultiviert. Diese zeigten den gleichen Phänotyp wie im oben beschriebenen Experiment. Außerdem wurde ein OpuB⁻ Stamm (LTB28), ein OpuC⁻-Stamm (LTB27) und ein OpuB⁻OpuC⁻-Stamm (LTB29), jeweils im GbsR⁻ Hintergrund, genutzt, da eine Translokation durch OpuB und OpuC vermutet wurde. Ein Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen (1.2 M NaCl) mit dem Cholin-Derivat Homocholin war nun in den Stämmen LTB26 (OpuB⁺), LTB24 (OpuC⁺), LTB28 (OpuB⁻) und LTB27 (OpuC⁻) möglich (Abbildung 41). Die Stämme wuchsen im Vergleich zu Kulturen ohne zusätzliche Solute (OD₅₇₈ von 0.4) bis auf eine OD₅₇₈ von 1.9 bis 2.5. Die Stämme LTB26 und LTB27, welche beide das Cholin-spezifische OpuB System besitzen, wuchsen mit Homocholin auf eine OD₅₇₈ von 1.8 und 2, während die Stämme LTB24 und LTB28, die den OpuC ABC Transporter tragen, auf eine OD₅₇₈ von 2.5, was auch mit dem kompatiblen Solut Glycin Betain möglich war (Abbildung 41).

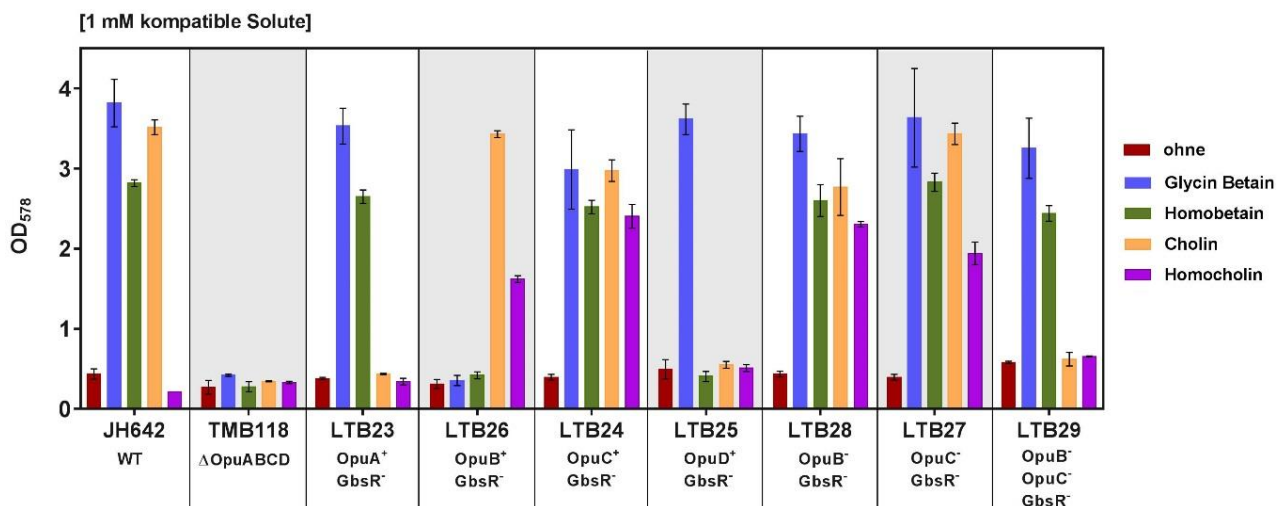


Abbildung 41: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Aus diesem Wachstumsverhalten kann geschlossen werden, dass 1 mM Homocholin in einem OpuC⁺/GbsR⁻-Stamm eine gleich gute Osmoprotektion bietet wie Glycin Betain oder auch Cholin. Über das OpuB System kann zwar auch eine Protektion der Zellen durch Homocholintransport stattfinden, allerdings schlechter als über das OpuC System. Das Substratspektrum der einzelnen Opu-Transportsysteme hat sich überdies nicht verändert, weshalb hierauf nicht weiter eingegangen wird.

Mit Hilfe einer Wachstumskurve sollte überprüft werden, ob der Stamm mit dem OpuC Transportsystem (LTB24) tatsächlich ein besseres Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen in Anwesenheit von 1 mM Homocholin zeigt als der Stamm LTB26, der lediglich den OpuB ABC Transporter besitzt. Hierfür wurden diese und weitere Stämme (JH642, TMB118, CAB5 und LTB29) in einem MicroplateReader für 30 Stunden bei 37°C und schüttelnd inkubiert. Das Inkubationsvolumen betrug 500 µl. In Abbildung 42 wird deutlich, dass der Stamm CAB5 (OpuABCD⁺, blau) mit Homocholin nur etwas später in die Log-Phase übergeht als mit Cholin, ansonsten aber zur gleichen Zeit (25 Stunden) die stationäre Phase erreicht. Dieser Stamm besitzt sowohl den OpuB also auch den OpuC ABC Transporter. Der Stamm LTB24 (OpuC⁺, grün) zeigt ein nur minimal schlechteres Wachstum als der Stamm CAB5 (Abbildung 42), sodass davon ausgegangen werden kann, dass der OpuC Transporter im Stamm CAB5 den größten Teil des Homocholins in die Zelle transportiert. Betrachtet man die Homocholin-Wachstumskurve des Stammes LTB26 (OpuB⁺), so fällt auf, dass diese eine stark verzögerte lag-Phase besitzt und die log-Phase erst erreicht wird, nachdem der Stamm LTB24 (OpuC⁺) schon in der stationären Phase ist. Allerdings ist ein erheblich besseres Wachstum im Vergleich zum Stamm TMB118 (rot) zu sehen. Der Stamm LTB29 (OpuB⁻OpuC⁻, orange) ist nicht in der Lage mit Homocholin zu wachsen (Abbildung 42), was bestätigt, dass Homocholin lediglich über die beiden nah verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC transportiert wird. Wachstumskurven mit den kompatiblen Soluten Glycin Betain und Homobetain als Osmoprotektiva bestätigen, dass diese beiden Substrate über OpuC und OpuA, nicht aber über OpuB, aufgenommen werden können (Abbildung 69).

Die Wachstumsexperimente zeigen, dass Homocholin nicht wie Cholin an GbsR binden kann und sich der Repressor so von der DNA löst. Möglicherweise ist die Bindetasche von GbsR zu spezifisch für den Induktor Cholin. Eine Protektion mit Homocholin ist also nur möglich, wenn der Repressor deletiert wurde.

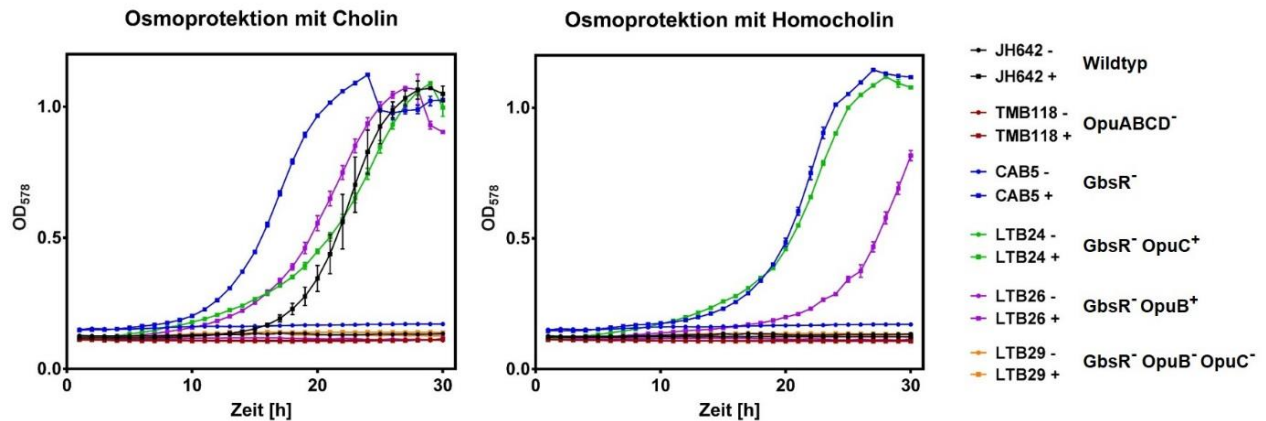


Abbildung 42: Wachstumskurven verschiedener *B. subtilis* Stämme zur detaillierten Analyse der osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 1 mM Cholin und Homocholin 30 Stunden in einem MicroplateReader schüttelnd bei 37°C kultiviert und die OD₅₇₈ stündlich photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem [*methyl*-¹⁴C]-Cholin Chlorid wurde die Inhibitorkonstante von Homocholin für den Transport über die ABC Transporter OpuB und OpuC gemessen. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Cholins wurde zum einen ohne den Inhibitor Homocholin und zum anderen in Anwesenheit von Homocholin über die Zeit gemessen. Hierbei wurde eine Inhibitorkonzentration gewählt, bei der die Aufnahme von Cholin zu 50% inhibiert wurde. Die Aufnahme von Cholin ohne Inhibitor folgte einer Michaelis-Menten Kinetik (Abbildung 43). Bei der Aufnahme in Anwesenheit von Homocholin nähert sich die Kurve der gleichen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) an, weshalb in allen Fällen von einer kompetitiven Inhibition ausgegangen werden kann (Abbildung 43). Der K_i -Wert wurde dann über den Fit „competitive Inhibition“ mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert (Tabelle 17).

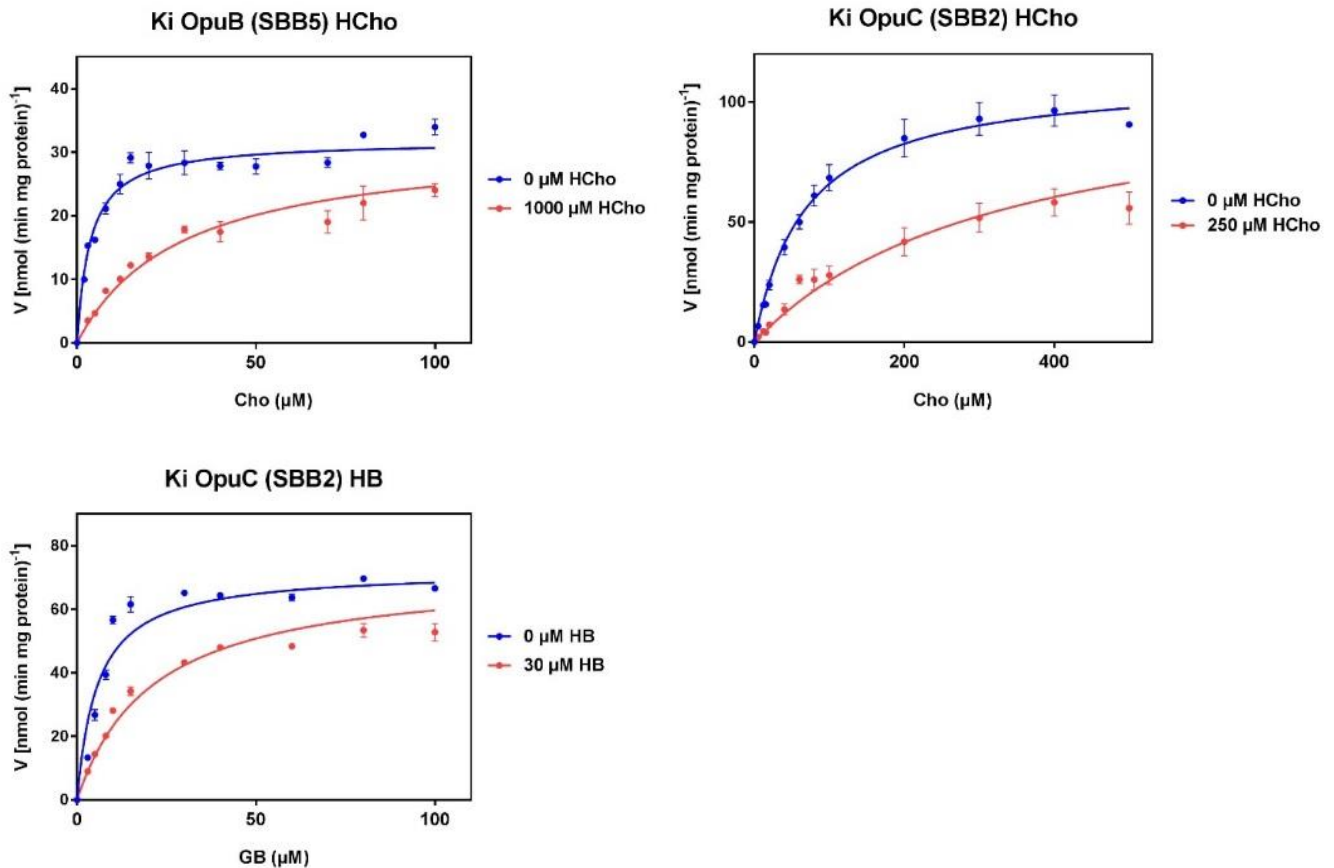


Abbildung 43: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von [methyl- ^{14}C]-Cholin [1- ^{14}C]-Glycin Betain und über OpuB oder OpuC zur Bestimmung von Inhibitionskonstanten.

Kompetitive Inhibitionen von Cholin in Ab- (blau) und Anwesenheit (rot) von Homocholin und von Glycin Betain in Ab- (blau) und Anwesenheit (rot) von Homobetain. Für den OpuB ABC Transporter wurde 1 mM Homocholin als Inhibitor eingesetzt und für den OpuC Transporter 250 μM Homocholin. Bei der kompetitiven Inhibition mit Homobetain wurde für den OpuC ABC Transporter 30 μM Homobetain eingesetzt. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung.

Vergleicht man die Affinitäten für Homocholin in OpuB und OpuC miteinander, fällt auf, dass der OpuC Transporter mit einem K_i -Wert von 64 μM eine doppelt so hohe Affinität zu Homocholin besitzt als der OpuB Transporter mit einem K_i -Wert von 145 μM (Tabelle 17). Der OpuC ABC Transporter kann außerdem Homocholin genauso gut binden wie Cholin, während der hochspezifische Cholin Transporter OpuB Homocholin 36-fach schlechter bindet als seinen natürlichen Liganden Cholin. Zusätzlich bietet das OpuC System eine 3,5-höhere V_{max} als das OpuB System, sodass der OpuC⁺-Stamm Homocholin unter Hochsalz schneller aufnehmen kann als ein OpuB⁺-Stamm.

Bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem [1- ^{14}C]-Glycin Betain wurde das kompatible Solut Homobetain als Inhibitor zugegeben, um die Inhibitionskonstante für Homobetain zu bestimmen. Die Affinität von OpuC zu Homobetain liegt mit 11 μM nahe dem K_m -Wert zu

Glycin Betain (6 μM), sodass der OpuC Transporter Homobetain mit hoher Affinität binden und transportieren kann (Tabelle 17).

Tabelle 17: Kinetische Parameter der ABC Transporter OpuB und OpuC für Cholin, Homocholin, Glycin Betain und Homobetain.

Transporter	Substrat	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m/K_i (μM)
OpuB	Cholin	32 ± 1	4 ± 1
OpuB	Homocholin		145 ± 18
OpuC	Cholin	111 ± 3	68 ± 52
OpuC	Homocholin		64 ± 3
OpuC	Glycin Betain	72 ± 2	6 ± 1
OpuC	Homobetain		11 ± 2

Die kinetischen Parameter zeigen, dass die beiden nahe verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC in der Lage sind das Cholin-Derivat Homocholin zu binden und zu transportieren. In Abbildung 44 ist ein „Docking“ Experiment gezeigt, in dem das Substrat Homocholin *in-silico* in die kristallisierten Strukturen von OpuBC und OpuCC mit Hilfe der Software PyMOL [134] eingeführt wurde, um zu zeigen, dass dieses Substrat stöchiometrisch in die Bindetasche der SBPs passt. Diese Berechnung wurde von Herrn Dr. Sander Smits (Universität Düsseldorf) durchgeführt. Abbildung 44A zeigt OpuCC mit Homocholin als Substrat. Es wird deutlich, dass die Alkoholgruppe von Homocholin aus der aromatischen Bindetasche herausragt und die Bindung durch das Threonin an Position 74 (T⁷⁴) nicht gestört wird. Abbildung 44B zeigt das Docking-Modell für das SBP OpuBC mit Homocholin. Auch hier ragt die Seitengruppe des Liganden aus der aromatischen Box heraus, allerdings liegt hier das Aspartat (D⁷⁴) deutlich näher zum Liganden, sodass hier eine effektive Bindung gestört sein könnte.

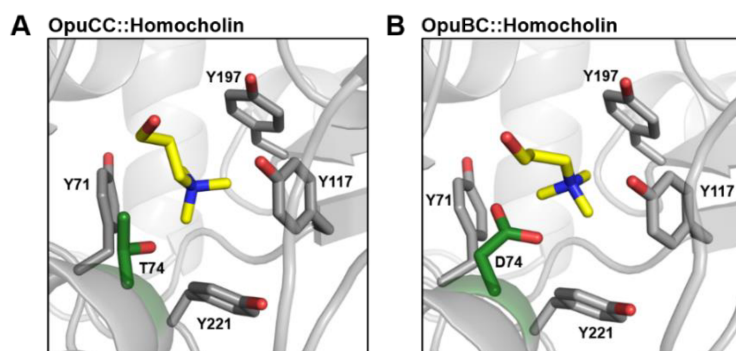


Abbildung 44: *in-silico* „Docking“ von Homocholin in die Substratbindetasche von OpuBC und OpuCC.

Gezeigt ist die aromatische Substratbindetasche von OpuCC (A) und OpuBC (B). In grün ist die Aminosäure an der Position 74 gefärbt; ein Threonin (T) im OpuCC und ein Aspartat (D) im OpuBC.

Die Messung des radioaktiv markierten Glycin Betains über den OpuA Transporter zeigte selbst mit 500-fachem Überschuss von Homobetain keine Inhibition (Abbildung 70), sodass für diesen Transporter kein K_i -Wert berechnet werden konnte. Die Affinität zu Homobetain scheint sehr schlecht zu sein. Da OpuA allerdings ein sehr schnelles Transportsystem mit einer V_{\max} von 282 ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) ist [36], kann vermutet werden, dass 1 mM von Homobetain in Osmoprotektionsassays genügt um die Zelle vor Salzstress zu schützen. Um dies zu testen wurde ein Osmoprotektionsassay mit geringeren Konzentrationen von Homobetain durchgeführt, in dem ersichtlich wird, dass 50 μM Homobetain in einem *B. subtilis* Stamm mit einem OpuC Transportsystem einen etwa dreifach höheren osmotischen Schutz bietet als in einem *B. subtilis* Stamm mit einem OpuA ABC Transporter (Abbildung 71). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass OpuC eine viel bessere Affinität zu Homobetain bietet als OpuA.

4.6.2 Homocholin selbst besitzt keine osmoprotektiven Eigenschaften und muss weiter oxidiert werden

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden konnte ist eine osmoprotektive Wirkung von Homocholin nur in Abwesenheit des *gbsAB* Repressors GbsR möglich. Es liegt nahe, dass durch die folglich Induktion der *gbsAB* Expression die Synthese von Homobetain über die beiden Dehydrogenasen GbsB und GbsA ermöglicht wird. Um diese Abhängigkeit zu überprüfen, wurden Stämme in Hochsalzmedium kultiviert, in denen nur *gbsR* (CAB5), nur *gbsAB* (CAB6) und *gbsR* und *gbsAB* (CAB7) zusammen deletiert wurden. Den Kulturen wurden Glycin Betain, Homobetain, Cholin und Homocholin zugegeben und die OD_{578} nach 17 Stunden gemessen. Der Wildtyp JH642 konnte wie bereits gezeigt in Anwesenheit von Homocholin keine Protektion der Zellen erreichen, da GbsR in diesem Stamm vorhanden ist (Abbildung 45). Wird der Repressor deletiert, so wird nun eine volle Osmoprotektion erreicht. Wird nun nur das *gbsAB* Operon deletiert (CAB6), so ist wiederum kein Wachstum mit Homocholin möglich. Auch Cholin kann keine Protektion bieten, da die Glycin Betain Synthese Enzyme GbsB und GbsA nicht vorhanden sind (Abbildung 45). Cholin selbst ist demnach nicht osmoprotektiv und die Zelle ist auf eine Synthese von Glycin Betain angewiesen. In einem Stamm, der sowohl die Glycin Betain Synthese Enzyme GbsB und GbsA als auch deren Repressor GbsR nicht mehr besitzt, so wird deutlich, dass Cholin und Homocholin selbst keine eigenen osmoprotektiven Eigenschaften besitzen und die Dehydrogenasen GbsB und GbsA die Umsetzung von Homocholin zu Homobetain vermitteln.

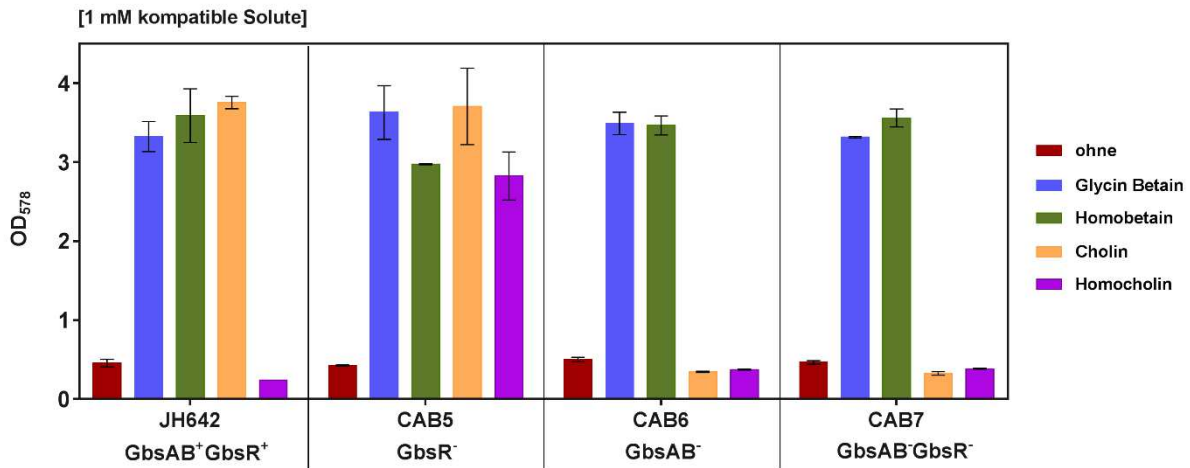


Abbildung 45: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von kompatiblen Soluten.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Wird Homocholin in der Zelle von *B. subtilis* akkumuliert und kann durch die Anwesenheit des Repressors GbsR nicht osmoprotektiv genutzt werden, so wird vermutet, dass die Zelle durch den Salzstress, den sie in hyperosmotischen Bedingungen erfährt, Prolin *de-novo* synthetisiert [9, 51, 52]. Um den Einfluss von Homocholin in Anwesenheit von GbsR, also wenn die Zelle kein kompatibles Solut zum Schutz zur Verfügung hat, und in dessen Abwesenheit, wenn die Zelle vermutlich durch Homobetainsynthese protektiert wird, wurde die intrazelluläre Prolinkonzentration gemessen. Hierfür wurden die Stämme JH642 (GbsR⁺) und CAB5 (GbsR⁻) in SMM mit 0.4 M und 0.8 M NaCl kultiviert. In Ab- und Anwesenheit von 1 mM Glycin Betain, Cholin, Homobetain oder Homocholin wurden die Stämme bis zu einer OD₅₇₈ von 1.8 inkubiert und die intrazelluläre Prolinkonzentration, wie in 3.5.3 beschrieben, bestimmt. Ohne kompatible Solute wurden bei 0.4 M NaCl 71-79 mM und bei 0.8 M NaCl 261-324 mM Prolin synthetisiert (Abbildung 46 A). Die Anwesenheit von GbsR hat bei Salzstress nahezu keinen Einfluss auf die Prolinbiosynthese. Bei 0.8 M NaCl mussten die Stämme zum osmotischen Schutz etwa vier Mal so viel Prolin produzieren als bei 0.4 M NaCl (Abbildung 46). Wurden die kompatiblen Solute Glycin Betain, Cholin oder Homobetain zu den Kulturen gegeben, hat die Zelle nur zwischen 2-3 mM Prolin synthetisiert. Alle drei kompatiblen Solute wurden favorisiert aufgenommen, sodass eine Prolinbiosynthese nicht mehr angeschaltet werden musste. Wird dem GbsR⁻-Stamm Homocholin zugegeben, kann dieses über GbsB und GbsA zu einem osmoprotektiven Solut, vermutlich Homobetain, oxidiert werden, sodass auch in diesem

Fall sowohl bei 0.4 M NaCl als auch bei 0.8 M NaCl keine Prolinbiosynthese nötig ist (Abbildung 46). Bei dem GbsR⁺-Stamm war zu erwarten, dass dieser nicht in der Lage ist ein Osmoprotektivum zu synthetisieren, da *gbsAB* reprimiert wird. Da die Zelle in dieser Situation Salzstress erfährt, wäre eine Prolinsynthese vorherzusehen. Bei 0.4 M NaCl wird allerdings nur 3.1 mM Prolin im Vergleich zu 79 mM ohne Osmoprotektivum, produziert. Bei einer Salzkonzentration wurden im Vergleich zu 324 mM ohne kompatibles Solut nur 56 mM Prolin produziert, also etwa sechsfach weniger. Die Akkumulation von Homocholin scheint einen reprimierenden Einfluss auf die Prolinbiosynthese zu haben, was möglicherweise auf die verstärkte positive Ladung zurückzuführen ist.

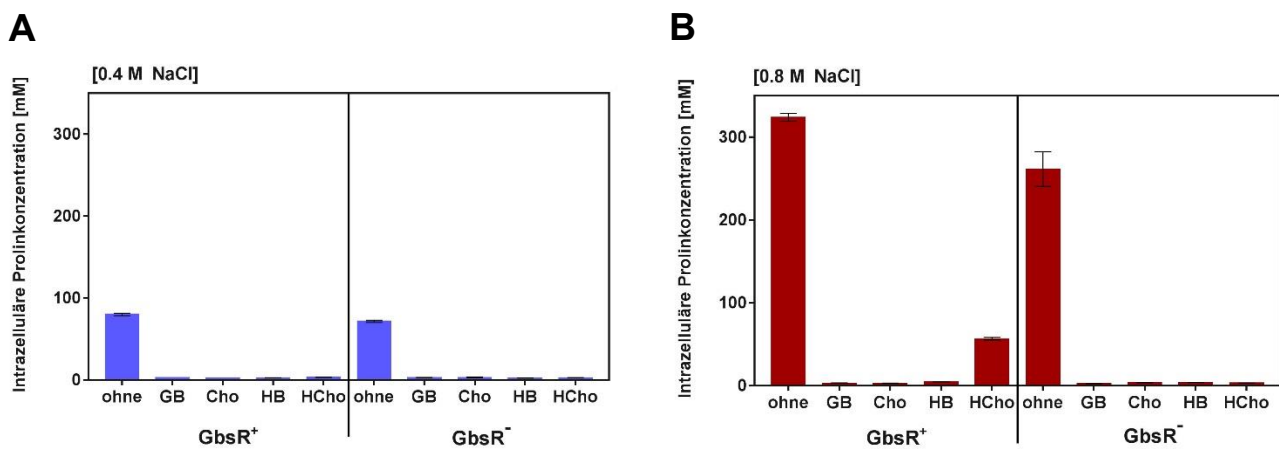


Abbildung 46: Einfluss von Homocholin auf die *de novo* Prolinbiosynthese.

Die *B. subtilis* Stämme JH642 (GbsR⁺) und CAB5 (GbsR⁻) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl (A) und 0.8 M NaCl (B) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mM Glycin Betain (GB), Cholin (Cho), Homobetain (HB) oder Homocholin (HCho) bis zur einer OD₅₇₈ von 1.8 kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in einer kolorimetrischen Prolin-Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Der Assay wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Um zu überprüfen, ob die Prolinbiosynthese ebenfalls negativ beeinflusst wird, wenn das kompatible Solut Cholin in der Zelle akkumuliert wird, wurde ein Stamm verwendet, in dem die Glycin Betain Biosynthesegene *gbsA* und *gbsB* deletiert wurden. Dieser Stamm (CAB6) kann also bei Zugabe von Cholin kein osmoprotektives Glycin Betain synthetisieren und die Akkumulation von Cholin wäre als Schutz vor osmotischen Stress nutzlos. In Abbildung 47 ist die intrazelluläre Prolinkonzentration der Stammes JH642 (GbsAB⁺) und CAB6 (GbsAB⁻) zum einen bei 0.4 M NaCl (rot) und zum anderen bei 0.8 M NaCl (grün) dargestellt. Der Stamm JH642 kann wie bereits in Abbildung 46 gezeigt Homocholin nicht als Osmoprotektivum nutzen, da in diesem Stamm ebenfalls der *gbsAB* Repressor GbsR vorhanden ist. Zugabe von Homocholin, und folglich eine Akkumulation des Substrates, beeinträchtigt die Prolinbiosynthese sichtbar. Der Stamm CAB6 kann ohne Cholin-Zugabe einen Prolinpool von 100 mM

(0.4 M NaCl) bzw. 305 mM (0.8 M NaCl) aufbauen (Abbildung 47). Mit zunehmender Salinität wird nimmt auch die Prolinproduktion zum Schutz der Zelle zu. Wird den Kulturen Cholin zugegeben, so können nur 16 mM Prolin produziert werden. Die Zelle erfährt in diesem Falle Salzstress und kann trotzdem keinen protektiven Prolinpool aufbauen, was die Vermutung, dass sich eine Akkumulation der positiven Ladung im Cholin/Homocholin negativ auf die Prolinbiosynthese auswirkt, bestärkt.

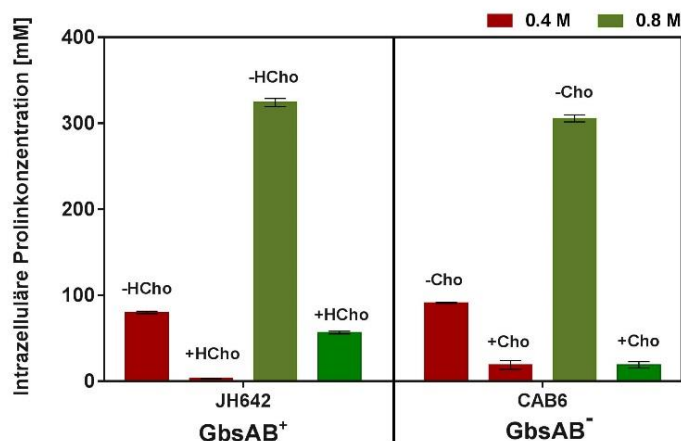


Abbildung 47: Einfluss der Homocholin und Cholin Akkumulation auf die *de novo* Prolinbiosynthese. Die *B. subtilis* Stämme JH642 (GbsAB⁺) und CAB6 (GbsAB⁻) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl (rot) und 0.8 M NaCl (grün) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mM Cholin (-/+ Cho) oder Homocholin (-/+ HCho) bis zur einer OD₅₇₈ von 1.8 kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in einer kolorimetrischen Prolinkonzentrationsbestimmung eingesetzt [129]. Der Assay wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

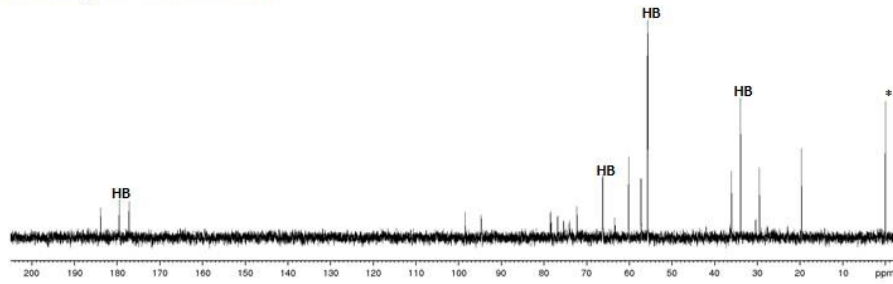
Es konnte nun mehrfach gezeigt werden, dass *B. subtilis* Zellen (GbsR⁺) bei hoher Osmolarität in Anwesenheit von Homocholin nicht wachsen können (Abbildung 40, 41, 42, 45). Zusätzlich konnte in Abbildung 46 und 47 gezeigt werden, dass eine Akkumulation von Homocholin (und auch Cholin) die Prolinbiosynthese inhibiert. Um zu testen, ob der negative Wachstumsphänotyp in Anwesenheit von Homocholin auf die Inhibition der osmoprotektiven Prolinbiosynthese zurückzuführen ist, wurde ein *B. subtilis* Stamm mit einer *proHJ* Deletion auf SMM Agarplatten mit 0.4 M NaCl in den Verdünnungsstufen 10⁰-10⁻⁴ ausplattiert (Abbildung 72). Dieser Stamm ist nicht mehr in der Lage Prolin *de-novo* zu synthetisieren (Hoffmann 2017). Da dieser Stamm (ProHJ⁻) aber in der Lage ist ebenso gut bei moderaten Salzkonzentrationen zu wachsen wie der Wildtyp Stamm JH642 (ProHJ⁺) (Abbildung 72), kann ausgeschlossen werden, dass der negative Wachstumsphänotyp in Anwesenheit von Homocholin darauf zurückzuführen ist, dass der Stamm nicht mehr in der Lage ist Prolin zu synthetisieren. Es müssen also durch die Akkumulation der positiven Ladungen noch weitere Prozesse in der Zelle negativ beeinflusst sein.

4.6.3 Homobetain Synthese aus dem Vorläufer Homocholin über GbsAB

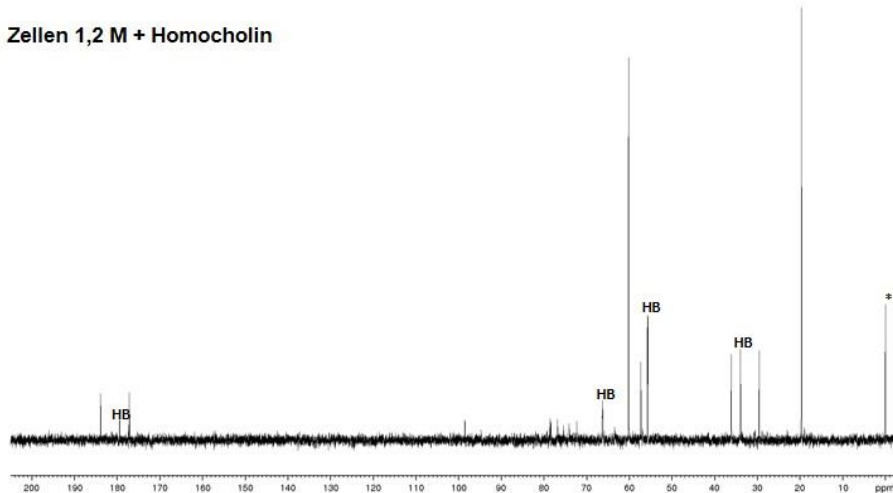
Aus den bisher dargestellten Ergebnissen leitet sich die Frage ab, ob die Dehydrogenasen GbsA und GbsB tatsächlich aus Homocholin das bekannte kompatible Solut Homobetain synthetisieren. Eine Abhängigkeit der Enzyme für die osmoprotektive Nutzung von Homocholin konnte in Abbildung 45 bereits nachgewiesen werden. Wurden die Gene für die Glycin Betain Synthese *gbsA* und *gbsB* deletiert, so war ein Wachstum von *B. subtilis* in Hochsalzmedium mit Homocholin nicht mehr möglich. Außerdem katalysieren die beiden Enzyme die Glycin Betain Synthese ausgehend vom Homocholin-Derivat Cholin.

Mit Hilfe von ^{13}C -NMR Spektren von Zellextrakten des Stammes BWB112 (GbsR⁻ ProHJ⁻) sollte qualitativ überprüft werden, ob die Zellen nach Aufnahme von Homocholin das kompatible Solut Homobetain synthetisiert haben. Als Kontrolle wurde der Stamm BWB112 mit Homobetain kultiviert und als Referenz dienten Homobetain und Homocholin als Reinsubstanzen. Betrachtet man die Spektren der Reinsubstanzen, fällt auf, dass im Spektrum für Homocholin kein Peak bei 179 ppm vorkommt. Dieser Peak steht für das Kohlenstoffatom, welches sich am Carboxy-Terminus des Homobetains befindet (Abbildung 48). Homocholin besitzt nur eine Alkohol-Gruppe, weshalb dieser Peak wegfällt. Für Homocholin gibt es dafür bei 61 ppm einen zusätzlichen Peak. Ansonsten sehen sich die beiden Spektren aufgrund der gleichen Grundstruktur mit der Trimethylammoniumgruppe von Homobetain und Homocholin sehr ähnlich aus. Betrachtet man nun das Spektrum des Zellextraktes des Stammes BWB112, welcher mit Homobetain kultiviert wurde, können alle Peaks, welche in der Homobetain Reinsubstanz auftauchen, wiedergefunden werden (Abbildung 48). Jedoch sind auch weitere Peaks sichtbar, welche nicht näher zugeordnet werden konnten. Das Spektrum für die Homocholin Kultivierung gleicht dem Spektrum für die Homobetain Synthese in Hinblick auf die Kohlenstoffdetektion. Da dieser Versuch nur dem qualitativen Nachweis der Homobetain Synthese aus Homocholin dienen soll, ist hierbei die Höhe der Peaks nicht von Bedeutung. Es konnte bei Homocholin Zugabe ein deutlicher Peak bei 179 ppm detektiert werden, welcher für das Kohlenstoffatom am Carboxy-Terminus des Homobetains steht. Ob das Homocholin vollständig zu Homobetain oxidiert werden konnte ist aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich, lediglich dass die Enzyme GbsA und GbsB nicht nur die Glycin Betain Synthese aus Cholin, sondern auch die Homobetain Synthese aus Homocholin katalysieren können.

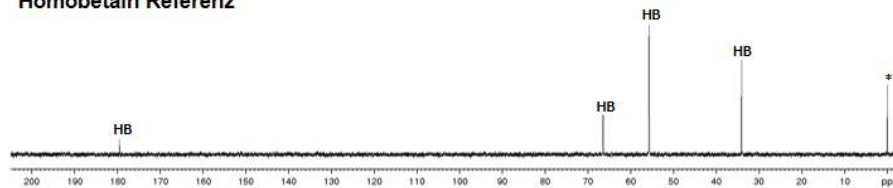
A Zellen 1,2 M + Homobetain



B Zellen 1,2 M + Homocholin



C Homobetain Referenz



D Homocholin Referenz

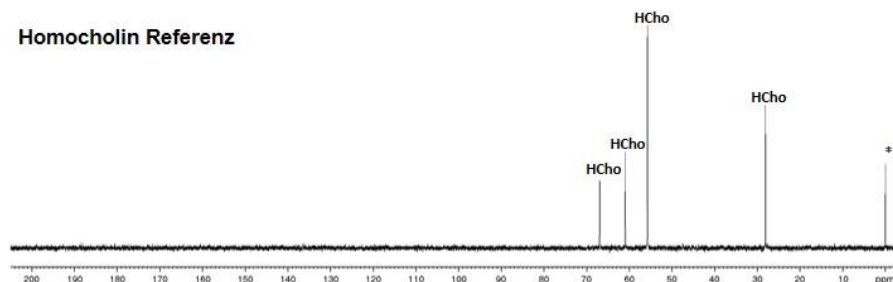


Abbildung 48: Qualitative Identifizierung von Homobetain und Homocholin mit Hilfe von ^{13}C -NMR Spektren.

Zu sehen sind zum einen ^{13}C -NMR Spektren von Zellextrakten des Stammes BWB112, gewachsen unter hyperosmotischen Bedingungen (SMM 1.2 M NaCl) mit 1 mM Homobetain (A) oder Homocholin (B). Zum anderen von den Reinsubstanzen Homobetain (C) und Homocholin (D). Peaks, welche Kohlenstoffatome von Homobetain darstellen, wurden mit **HB** versehen und Peaks, die Kohlenstoffatome von Homocholin darstellen wurden mit **HCho** versehen. D4-3-(Trimethylsilyl) Propionat wurde als interner Standard genutzt und mit einem * markiert.

Um eine quantitative Analyse der Homobetain Synthese aus Homocholin durchzuführen, wurden die kompatiblen Solute Glycin Betain, Cholin, Homobetain und Homocholin aus Zellextrakten des Stammes CAB5 (GbsR⁻) mit Hilfe von LC-ESI-MS detektiert und quantifiziert. Die für diese Experimente nötige Kultivierung unterschiedlicher Stämme wurde von mir durchgeführt, die LC-ESI-MS Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Andreas Seubert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Als Referenzen dienten hierbei ebenfalls die jeweiligen Reinsubstanzen. In Abbildung 49 ist zu sehen, dass bei 0.8 M NaCl und 1 mM Glycin Betain im Medium etwa 620 mM intrazelluläres Glycin Betain vorhanden ist. Homobetain, Cholin oder Homocholin wurden nicht detektiert. Wird dem Stamm das Substrat Cholin zugegeben, wird ersichtlich, dass durch die Glycin Betain Synthese über GbsAB 498 mM Glycin Betain synthetisiert wurden und kein Cholin mehr in der Zelle vorhanden war (Abbildung 49). Bei Homobetain Zugabe konnten 480 mM Homobetain detektiert werden und ein Vorhandensein von Glycin Betain, Cholin oder Homocholin konnte ausgeschlossen werden. Durch die Zugabe von 1 mM Homocholin zum Medium konnten 384 mM intrazelluläres Homobetain und nur 19 mM Homocholin gemessen werden (Abbildung 49). Die Substrate Glycin Betain und Cholin wurden nicht detektiert. Diese Daten zeigen, dass das kompatible Solut Homocholin fast vollständig zu dem Glycin Betain Derivat Homobetain umgewandelt wird und die Zelle durch diese Synthese vor hohen Salinitäten geschützt werden kann.

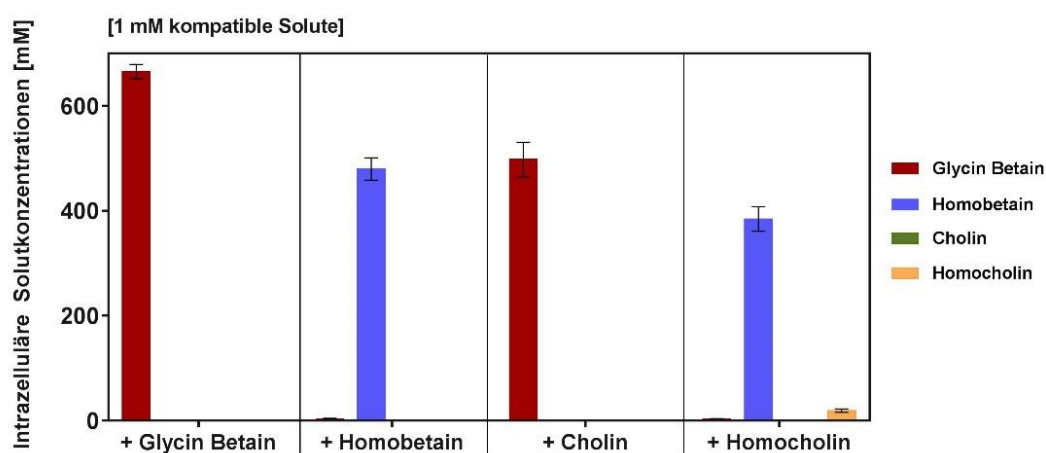


Abbildung 49: Quantitative Identifizierung von Homobetain und Homocholin mit Hilfe von LC-ESI-MS.

Die intrazelluläre Konzentration von Glycin Betain (rot), Homobetain (blau), Cholin (grün) und Homocholin (orange) wurde aus Zellextrakten des Stammes CAB5 (GbsR⁻), gewachsen unter hyperosmotischen Bedingungen (SMM 1.2 M NaCl) mit 1 mM Glycin Betain (+Glycin Betain), Homobetain (+Homobetain), Cholin (+Cholin) oder Homocholin (+Homocholin), mit Hilfe von LC-ESI-MS bestimmt. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen bestimmt.

4.6.4 Homocholin als Induktor für GbsR

Eine osmotische Protektion von *B. subtilis* mit dem Substrat Homocholin konnte nur in Abwesenheit des *gbsAB* Repressors GbsR erfolgen. Nur dann war eine Expression von *gbsAB* gegeben und die Oxidation von Homocholin zu Homobetain konnte ermöglicht werden. Um eine Induktion durch Homocholin zu ermöglichen, ist vermutlich eine größere Bindetasche in GbsR notwendig, sodass das strukturell längere Substrat ebenfalls gebunden werden kann. Um eine Mutation zu finden, welche die Bindung von Homocholin an GbsR ermöglicht wurde ein genetischer Screen entwickelt. Durch den Mutatorstamm *E. coli* XL1-Red wurden zufällig Mutationen in das, auf einem Plasmid liegende Gen *gbsR*, oder dessen authentischen Promotor eingeführt. Die erhaltenen Plasmide (pLT39*), welche einen Replikationsursprung für *B. subtilis* besaßen, wurden in ein *B. subtilis* Stamm gebracht, welcher kein natürliches *gbsR* Gen sowie eine LacZ-Reporterfusion (*gbsA-lacZ*) trug. Als Kontrolle dienten Plasmide, welche entweder kein Gen (pGP380, GbsR⁻) oder das Wildtyp Gen (pLT39, GbsR⁺) trugen (Tabelle 8). Die erhaltenen *B. subtilis* Stämme wurden auf einem Minimalmedium kultiviert, in dem 0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal, das entsprechende Antibiotikum Erythromycin/Lincomycin (Tabelle 5) und 1 mM Homocholin enthalten war. Anders als die GbsR Deletionsmutante (LTB65), war der Kontrollstamm mit intaktem GbsR (LTB64) hier kaum fähig zu wachsen, da keine Umwandlung zu Homobetain als Osmoprotektivum möglich war. Alle hier gewachsenen Klone mit dem mutierten pLT39 Plasmids (*gbsR**) wiesen eine blaue Färbung auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass all diese *gbsR* Genvarianten zu einer Expression von *gbsA* führten. Allerdings können hierbei keine Mutationen ausgeschlossen werden, die zu einem „frame-shift“, oder vorzeitigem Stopp-Codon führten. Diese GbsR Proteine wären nicht intakt und entsprechen der GbsR⁻ Kontrolle. Nach zwei Vereinzelungsschritten wurden die Klone dann auf den Kontrollmedien (0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal, Erythromycin/Lincomycin (Tabelle 5), 1 mM Cholin und 0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal und Erythromycin/Lincomycin) ausgestrichen, um zu überprüfen, ob die vorliegende GbsR weiterhin den natürlichen Liganden Cholin binden kann. Wenn kein Induktor vorhanden ist, sollte sich der Klon bei intaktem GbsR keine Blaufärbung zeigen. Die GbsR Wildtyp-Kontrolle zeigte hier keine Blaufärbung, da der Repressor GbsR die DNA weiterhin bindet, während die GbsR Deletionsmutante eine blaue Färbung aufwies. Von 88 getesteten Klonen konnten zwei Klone identifiziert werden [Klon 18 und Klon 51 (Abbildung 50)], welche keine Blaufärbung aufwiesen.



Abbildung 50: Blau-Weiß Screening zur Identifizierung von einer Homocholin induzierbaren GbsR Mutante.

Es wurden 20 verschiedene Klone auf drei unterschiedlichen Medien auf ihre Blaufärbung getestet. Alle Medien bestehen aus SMM 0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal, Erythromycin/Lincomycin (Tabelle 5). Im Medium auf der linken Seite befindet sich zusätzlich 1 mM Homocholin und im Medium in der Mitte 1 mM Cholin. Rechts wurde kein Induktor zugegeben. Alle getesteten Klone besitzen eine *gbsA-lacZ* Reportergenfusion und eine Deletion des Gens *gbsR*. Die Stämme wurden dann mit einem Plasmid transformiert, welches entweder kein *gbsR* (Leerplasmid pGP380, Δ), das natürliche *gbsR* (Plasmid pLT39, wt) oder ein zufällig mutiertes *gbsR* (Plasmide pLT39*, 1-20) besaß. Rot umkreist wurde der Klon (18), welcher als einziger, neben der Wildtypkontrolle, keine Blaufärbung auf dem Kontrollmedium ohne Induktor aufwies, sodass davon ausgegangen werden kann, dass GbsR intakt ist und *gbsA* reprimiert.

Die Sequenzierung des Gens *gbsR* der beiden Klone zeigte die gleiche Mutation. An der Position 88 wurde ein Threonin zu einem Alanin ausgetauscht (Codon 88: ACA \rightarrow GCA in beiden Fällen) (Abbildung 51). Erstaunlicherweise befindet sich die Mutation nicht, wie erwartet, in der putativen Cholin Bindebox, sondern im flexiblen Linkerbereich von GbsR.

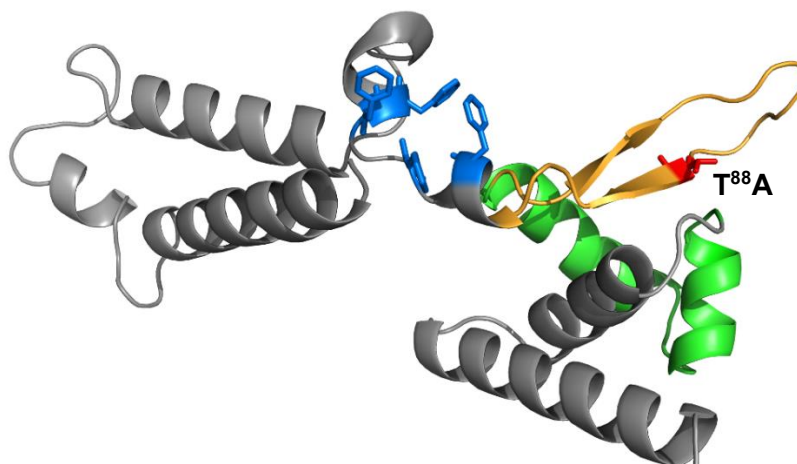


Abbildung 51: Monomer des *in-silico* Modells des Repressors GbsR aus *B. subtilis* mit markierter Mutation GbsR-T⁸⁸A.

Das *in-silico* Modell wurde mit dem Webserver SWISS-Model [133] auf Grundlage der Struktur des Proteins Mj223 (PDB: 1ku9) aus *Methanocaldococcus jannaschii* errechnet [38, 87]. Die vorhergesagte Bindetasche für Cholin, bestehend aus vier Phenylalaninen, ist in blau dargestellt. Das Helix-Turn-Helix Motiv, welche die DNA-Bindung ermöglicht ist grün markiert. In orange wurde die bewegliche Linkerdomäne dargestellt. Rot markiert wurde die Aminosäure (Threonin88), die im Blau-Weiß Screening als Homocholin-induzierbare Mutante (GbsR-T⁸⁸A) identifiziert wurde.

Zusätzlich wurden als Kontrolle zwei blaue Klone (Klon 19 und Klon 20) untersucht und ebenfalls das Gen *gbsR* sequenziert. Diese Klone besaßen einen Basenaustausch, welcher zu einem Stopp-Codon führte (Q¹²²Stopp). Um die *gbsA* Expression dieser vier Klone und die der Kontrollstämme [LTB64 (*GbsR*_{wt}), LTB65 (*GbsR*⁻)] zu untersuchen, wurde die Reporter-genfusion (*gbsA-lacZ*), welche in allen Stämmen vorhanden ist, genutzt. Hierbei wurde wie in 3.5.2 beschrieben vorgegangen. In der Wildtypsituation (LTB64) ist nur eine LacZ-Aktivität bei Zugabe des natürlichen Induktors Cholin vorhanden (Abbildung 52). Ohne Induktor und auch bei Zugabe von Homocholin bindet der Repressor *GbsR* weiterhin an die DNA und *gbsA* wird nicht abgelesen. Ohne Repressor (LTB65) ist keine Repression von *gbsA* mehr möglich, sodass in Ab- und Anwesenheit von Cholin und Homocholin eine ähnliche LacZ-Aktivität von 80-110 Miller Units vorhanden ist (Abbildung 52). Dieser Phänotyp findet sich auch für die Mutanten (Klon 19 und 20), welche ab der Aminosäureposition 122 (*GbsR*_{wt}: 180 Aminosäuren) ein frühzeitiges Stopp-Codon besitzen. Die LacZ-Aktivitätsmessung in den beiden Klonen 18 und 51 (*GbsR*-T⁸⁸A) ergab, dass eine Repression der *gbsA* Expression ohne Induktor weiterhin möglich ist (Abbildung 52). Auch das Expressionslevel in Anwesenheit von Cholin gleicht in etwa dem des Wildtyp Proteins. Wird das System allerdings nun mit dem Substrat Homocholin induziert, so ist nun eine erhöhte LacZ-Aktivität messbar. Die *gbsA* Expression ist zwar nur halb so hoch wie mit dem natürlichen Induktor Cholin, allerdings scheint eine Bindung von Homocholin an die Mutante *GbsR*-T⁸⁸A möglich zu sein, da ohne Induktor keine Aktivität vorhanden ist.

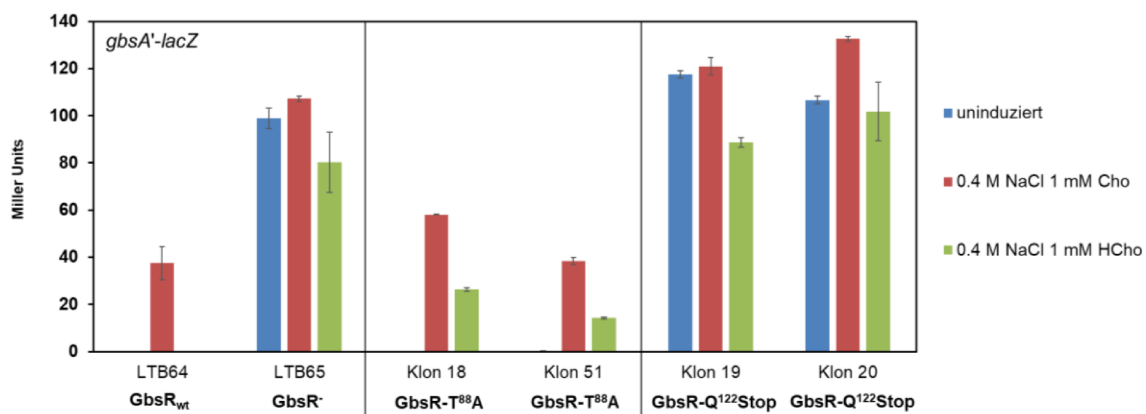


Abbildung 52: Genetische Kontrolle der *gbsA*-Expression in An- und Abwesenheit von Cholin und Homocholin unter Einfluss von *GbsR*-Mutanten.

Die verschiedenen *B. subtilis* Stämme mit verschiedenen *GbsR* Mutationen wurden in SMM bei 37 °C im Wasserbad kultiviert und Proben bei einer OD₅₇₈ von 0,25 geerntet (blau). Selbige Kulturen wurden mit NaCl (Endkonzentration 0.4 M) und Cholin (Endkonzentration 1 mM, rot) oder Homocholin (Endkonzentration 1 mM, grün) versetzt und nach 90 Minuten Inkubation geerntet. *GbsR*_{wt} (LTB64) und *GbsR*⁻ (LTB65) dienen als Kontrollen. Da alle Proben in einem Experiment vermessen wurden, können die *gbsA*-Aktivitäten miteinander verglichen werden. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung, die aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen resultiert.

Dass die Bindung von Homocholin in der GbsR-T⁸⁸A Mutante nicht so effizient ist wie die Bindung von Cholin, konnte auch in einem Wachstumsversuch unter hochosmolaren Bedingungen gezeigt werden. Hierfür wurden die oben beschriebenen *B. subtilis* Stämme bei 1,2 M NaCl und in An- und Abwesenheit von 1 mM Homocholin, Cholin, Glycin Betain und Homobetain kultiviert und nach 17 Stunden die OD₅₇₈ gemessen. Interessanterweise wiesen nur die Stämme, die kein intaktes GbsR mehr besaßen (LTB65, Klon 19, Klon 20), osmoprotektives Wachstum in Anwesenheit von Homocholin auf (Abbildung 53). Die Mutanten, welche die GbsR Mutante GbsR-T⁸⁸A besaßen (Klon 18 und 51) und bei denen eine *gbsA* Expression mit Homocholin induziert werden konnte, konnten mit diesem Substrat nicht wachsen (Abbildung 53). Scheinbar reicht das Induktionslevel nicht aus, um das Homocholin vollständig über GbsA und GbsB zu Homobetain umzuwandeln.

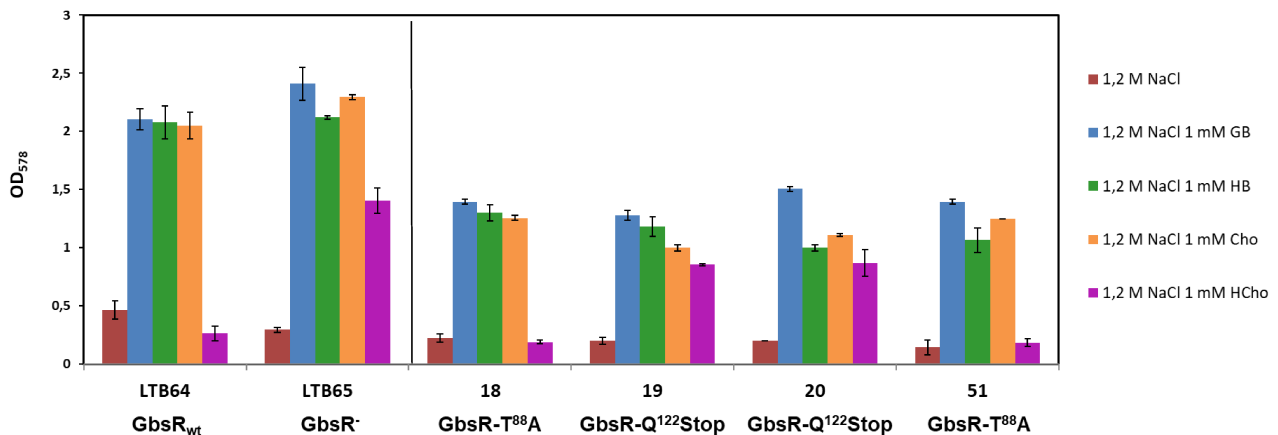


Abbildung 53: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Analyse osmoprotektiver Eigenschaften von unterschiedlichen kompatiblen Soluten. Die Stämme wurden in SMM mit 1,2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

5. Diskussion und Ausblick

In *B. subtilis* konnten bisher 38 SBP-abhängige ABC Transporter identifiziert werden [113] von denen drei, OpuA, OpuB und OpuC, eine sehr wichtige Rolle bei der Anpassung an eine hohe Osmolarität im Boden spielen [8, 9]. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Substratbindepoteins bei der Determinierung der Substratspezifität der ABC Transporter OpuB und OpuC näher untersucht, sowie deren Evolution bioinformatisch aufgeklärt. Weiterhin konnte ein neuartiges Aufnahmesystem für kompatible Solute identifiziert und charakterisiert werden. Dieser ABC Transporter besitzt ein hybrides Protein bestehend aus TMD und SBP. Besonders der Repressor der Glycin-Betain Synthese GbsR spielt eine wichtige Rolle in der osmotischen Stressantwort von *B. subtilis*. In dieser Arbeit konnten eine Reihe von Mutanten gefunden werden, welche zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktionalität des Proteins beitrugen. Hierbei konnte insbesondere die Bedeutung einer flexiblen Linkerregion von GbsR für dessen DNA-Bindeeigenschaften gezeigt werden. Desweiteren konnte die Rolle des Cholin-Derivats Homocholin in der osmotischen Stressantwort aufgeklärt werden. Dieses Substrat zeigt über die Synthese zu Homobetain osmoprotektive Eigenschaften in *B. subtilis*, welche in dieser Arbeit analysiert wurden.

5.1 Substratspezifitäten der nah verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC

Die ABC Transporter OpuB und OpuC besitzen eine sehr hohe Sequenzidentität zueinander (insgesamt 71%) und deren Operone liegen im Genom von *B. subtilis* sehr nahe beieinander. Betrachtet man die Ligandenbindestelle in den beiden SBPs OpuBC und OpuCC, stellt man fest, dass die gleichen vier aromatischen Aminosäuren in beiden Proteinen den für Substratbindestellen typischen „aromatic cage“ bilden [9, 115, 116]. Die Gemeinsamkeiten lassen vermuten, dass ein Transportsystem aus dem anderen entstanden ist. Durch phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, dass der hochspezifische Cholin Transporter OpuB im Laufe der Evolution aus dem promiskuitiven OpuC ABC Transporter entstanden ist (Abbildung 15). Möglicherweise ist diese Gendukation erstmals im Wildtyp Stamm *B. subtilis* NCIB 3610 oder einem nah verwandten Stamm entstanden, da das OpuB System hier, mit einer Ausnahme, erstmals auftaucht. Durch eine Duplikation von Genen kann häufig eine neue und effizientere Funktion für den Organismus entwickelt werden [150, 151]. Der OpuB Transporter könnte als eine Anpassung an das Leben im Erdboden entstanden sein, da Cholin eine wichtige Komponente in eukaryotischen Zellmembranen ist und durch verwittertes Pflanzenmaterial in

die Umwelt gelangen kann. Über den hoch affinen OpuB ABC Transporter könnte eine effizientere Aufnahme des Osmoprotektivums gewährleistet werden.

Worauf die unterschiedliche Substratspezifität von OpuB und OpuC basiert, sollte in dieser Arbeit näher studiert werden. Mit Hilfe von Opu-Transportermutanten konnte in Wachstumsversuchen unter hyperosmotischen Bedingungen sowie in Transportstudien mit radioaktiv markierten Substraten gezeigt werden, dass OpuB neben Cholin ebenfalls mit niedriger Affinität das kompatible Solut Carnitin transportieren kann (Tabelle 13) [46]. Im Vergleich zu diesem spezifischen ABC Transporter konnte für den OpuC ABC Transporter das vorhergesagte breite Substratspektrum gezeigt werden. Ein SBP-loses OpuB/OpuC ABC Transportsystem konnte keinen Transport von kompatiblen Soluten mehr vermitteln. In Osmoprotektionsassays mit 1.2 M NaCl konnten diese *B. subtilis* SBP-losen Opu Mutanten keine Protektion mehr zeigen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die beiden Transporter OpuB und OpuC SBP anhängig sind (Abbildung 8). Eine Bindung der Substrate an eine Bindestelle in den TMDs kann dadurch ausgeschlossen werden. Um zu analysieren, ob die SBPs tatsächlich das Substratspektrum eines ABC Transporter determinieren, wurden hybride Transportsysteme erstellt und in Hinblick auf das Substratspektrum untersucht. Obwohl SBP-abhängige ABC Transporter immer aus den gleichen Komponenten bestehen, wurde die Konstruktion eines funktionellen hybriden ABC Transporters bisher nur in einem Fall gezeigt. Hierbei wurden die ATPasen des *sn*-Glycerol-3-Phosphat Transporters (Ugp) und des Maltose Transporters (Mal) ausgetauscht [152, 153]. Da die ATPasen die am stärksten konservierten Untereinheiten des ABC Transporters sind [67], kann vermutet werden, dass ein Austausch der NBDs den Transportprozess nicht beeinträchtigt. Allerdings waren die hybriden Ugp/Mal ineffizienter im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp ABC Transportern [152, 153]. Diese Daten deuten an, dass ein Austausch von ABC Transporter Komponenten in der Evolution nicht vorgesehen ist. Im Fall der hybriden OpuB und OpuC Transporter wurden nicht die stark konservierten ATPasen ausgetauscht, sondern die SBPs, um zu untersuchen, ob das Substratspektrum dadurch verändert werden kann. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass der Austausch der SBPs (OpuB::OpuCC, OpuC::OpuBC) in den ABC Transportern OpuB und OpuC dazu führt, dass sich das Substratspektrum ebenfalls ändert (Abbildung 11). Der spezifische Transporter OpuB erlangt durch das Implantieren des OpuCC SBPs (OpuB::OpuCC) das breite Substratspektrum des OpuC Wildtyp Transportsystems. Im Gegenzug wurde der promiskuitive OpuC Transporter durch das SBP OpuBC (OpuC::OpuBC) zu einem spezifischen ABC Transporter für Cholin und Carnitin [46].

Die Effizienz des hybriden OpuB::OpuCC Transportsystems ist allerdings verglichen zum OpuC Wildtypsystem fünffach schlechter, während die Affinität der beiden Transporter zum hier getesteten kompatiblen Solut Glycin Betain gleich gut ist (Tabelle 13). Hierbei könnte eine verschlechterte Interaktion des „fremden“ SBPs OpuCC zu den TMDs des OpuB ABC Transporters eine Rolle spielen. Angelehnt an den Typ I Molybdat Transporter ModABC aus *Archaeoglobus fulgidus* [85] konnten durch Modelingstudien drei Interaktionsbereiche von OpuBC und OpuCC identifiziert werden, die möglicherweise bei der Interaktion zu den jeweiligen TMDs beteiligt sind [46]. Diese Regionen sind allerdings in ihrer räumlichen Struktur sowie ihrer Ladung in OpuBC und OpuCC sehr ähnlich, sodass es unwahrscheinlich ist, dass die verschlechterte Transporteffizienz des hybriden OpuB::OpuCC Systems durch eine gestörte Interaktion der Transporterkomponenten hervorgerufen wird. Es konnte weiterhin durch Western Blot Analysen festgestellt werden, dass das SBP OpuCC in einem Stamm, der nur den hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC besitzt, in geringeren Mengen vorliegt, als in einem Stamm, der nur das OpuC Wildtyp System besitzt (Abbildung 33). Da sich in entgegengesetzter Richtung zum *opuB* Operon eine SigB-abhängige Antisense RNA befindet [154, 155], könnte es sein, dass es durch die Unterbrechung des *opuB* Operons und somit auch der Antisense RNA zu destabilisierenden Effekten der mRNA des Transporters OpuB::OpuCC kommt. Auf die Ergründung dieser minimierten Transportermenge wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen. Der hybride ABC Transporter OpuB::OpuCC besitzt demnach eine schlechtere Transportgeschwindigkeit durch verringerte Transportermengen, sodass eine Protektion in hyperosmotischen Bedingungen ebenfalls verschlechtert ist. Wie die ineffiziente Osmoprotektion über den hybriden OpuB::OpuCC Transporter verbessert wurde, wird in Kapitel 5.3 näher beschrieben. Durch die Konstruktion von hybriden ABC Transportern konnte gezeigt werden, dass die SBPs OpuBC und OpuCC für die Substratspezifität von OpuB und OpuC verantwortlich sind. Außerdem konnten erstmals funktionelle hybride ABC Transporter erstellt werden, in denen die SBPs und nicht die hoch konservierten NBDs ausgetauscht wurden. Da bereits ABC Transportsysteme bekannt sind, in denen mehrere SBPs die gleichen TMD/NBD Komponenten nutzen wie z.B. im His/Lys/Arg Transporter in *Salmonella typhimurium* [112], stellte sich die Frage, ob ein einzelnes OpuCC SBP in einem Stamm mit intaktem spezifischen OpuB ABC Transporter ebenfalls mit den TMD/NBD Komponenten des OpuB Transporter interagieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass auch in Anwesenheit eines vollständigen OpuB Transportsystems die Zuschaltung eines einzelnen OpuCC SBPs zur vollständigen Osmoprotektion von *B. subtilis* mit kompatiblen Soluten wie Glycin Betain oder Homobetain führt, welche keine natürlichen Substrate des hoch spezifischen

OpuB Systems sind (Abbildung 6). Demnach ist ein *in-vivo* Austausch der SBPs OpuBC und OpuCC möglich. Laut diesen Ergebnissen könnte es *B. subtilis* ausreichen, ein vollständiges *opuC* Operon zu besitzen, um eine gute Transportgeschwindigkeit zu gewährleisten und zusätzlich das Gen *opuBC* zu exprimieren, um in einer Umgebung mit niedrigen Cholinkonzentrationen eine möglichst affine Bindung zu erreichen.

Da die Substratspezifität durch die SBPs OpuBC bzw. OpuCC determiniert wird, sollte eine detailliertere Analyse der Substratbindetaschen Unterschiede aufklären. Beide Proteine besitzen vier aromatische Aminosäuren, die eine Bindestelle bilden. Mutagenese von Bindetaschen-bildenden Aromaten führte in vorangegangenen Studien bei den SBPs OpuAC aus *B. subtilis*, ProX aus *A. fulgidus* und EhuB aus *Sinorhizobium meliloti* [45, 156, 157] zu einer drastischen Verschlechterung der Substratbindung. Aber auch Aminosäuren, die nicht die typische aromatische Bindetasche formen, können an der Bindung eines Substrates beteiligt sein. Mutagenesestudien in den SBPs OpuAC, OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* zeigten bereits, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Determinierung der Substratspezifität spielen, da Mutanten eine verschlechterte oder gar keine Bindung des Substrates mehr erlaubten [45, 115, 116]. Diese Studien basieren allerdings nur auf *in-vitro* Experimente. Die Substratspezifität der jeweiligen ABC Transporter *in-vivo* wurde hierbei nicht untersucht. Eine Gemeinsamkeit der Bindetaschen in OpuBC und OpuCC ist zum einen die Anordnung der vier Tyrosine (Y⁷¹, Y¹¹⁷, Y¹⁹⁷ und Y²²¹) und zum anderen die Stabilisierung der Seitenketten der kompatiblen Solute über die Aminosäure Q¹⁹ der Ligandenbindetasche. Im SBP OpuBC führt ein stabiles Wassernetzwerk über die Aminosäuren D⁷⁴, Y¹¹⁷ und L¹⁵⁵ zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Substrates Cholin. Die Bindetasche wird dadurch unflexibel und starr [116]. Auch die Aminosäure an Position 74 ist wichtig bei der Substratbindung [115, 116]. In OpuBC ist das negativ geladene Aspartat (D⁷⁴) neben der Ausbildung des Wassernetzwerkes an der Bindung der Hydroxygruppe von Cholin beteiligt, während die strukturell entsprechende Aminosäure Threonin (T⁷⁴) im OpuCC SBP unter anderem die Glycin Betain Bindung koordiniert. Negativ geladene Carboxygruppen werden hier nicht abgestoßen und auch eine Bindung von Liganden mit langen Seitenketten ist durch das größere Volumen denkbar. Im Gegensatz dazu würde in OpuBC die stark negative Ladung von D⁷⁴ und auch das verringerte Volumen der Bindetasche die Bindung von langen und/oder negativ geladenen Seitenketten verhindern.

In Broy (2015) konnten durch zielgerichtete Mutagenese bereits Mutanten erstellt werden, in denen diese Aminosäure an Position 74 in den SBPs OpuBC und OpuCC der ABC Transporter OpuB und OpuC ausgetauscht wurden [138]. Die Mutante OpuBC-D⁷⁴T konnte in Kooperation

mit Sander Smits der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit verschiedenen Liganden kristallisiert werden [138]. Eine Inspektion der Kristallstrukturen offenbarte, dass der Austausch D⁷⁴T zum einen zum Aufbrechen des Wassernetzwerkes und zum anderen zur Veränderung der Ladung der Bindetasche führte (Abbildung 21). Die negative Ladung des Aspartats ist nun nicht mehr vorhanden, sodass vermutet werden konnte, dass diese Bindetasche nun eine Bindung von verschiedenen Liganden ermöglicht. Vorläufige physiologische sowie kinetische Analysen der Mutanten OpuBC-D⁷⁴T und OpuCC-T⁷⁴D in der Dissertation von S. Broy zeigten, dass das Substratspektrum verändert wurde [138]. In dieser Arbeit wurde der mutierte OpuB-Transporter (OpuB-D⁷⁴T) in einen Stamm eingebracht, in dem der Repressor des *opuB*-Operons GbsR deletiert wurde. Hierdurch konnte das OpuB-D⁷⁴T-System dereprimiert werden, was es ermöglichte, das Substratspektrum eindeutiger zu bestimmen. Das Wachstumsexperiment der Transportermutante OpuC-T⁷⁴D wurde in diesem Zuge ebenfalls wiederholt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass der D⁷⁴T Austausch im OpuBC SBP zu einer Erweiterung des Substratspektrums führt, welches exakt das gleiche, wie im OpuC Wildtyp Transporter ist (Abbildung 19). Die Voraussagen aus der Analyse der Kristallstrukturen der Mutante, dass ein Threonin an dieser Position eine Aufhebung der negativen Ladung und eine Vergrößerung der Bindetasche bietet, konnten *in-vivo* bestätigt werden. Die physiologische und kinetische Analyse der hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC ließen allerdings vermuten, dass durch Austausch der Aminosäuren an Position 74 das Substratspektrum von OpuB und OpuC ebenfalls getauscht wird. Diese Hypothese konnte nicht vollständig bestätigt werden, da das Wachstum einer OpuCC-T⁷⁴D Mutante unter hyperosmotischen Bedingungen nicht nur mit Cholin und Carnitin, sondern auch mit den kompatiblen Soluten Glycin Betain, Crotonobetain und γ -Butyrobetain möglich war. Diese Substrate gehören nicht zum natürlichen Substratspektrum des OpuB Transportsystems. Das negativ geladene Aspartat (D⁷⁴) in der OpuCC Mutante verhindert scheinbar nicht die Bindung der strukturell ähnlichen kompatiblen Solute Glycin Betain, Crotonobetain und γ -Butyrobetain. Um genaue Aussagen zur Bindung dieser Liganden in OpuCC-T⁷⁴D machen zu können, müsste die Mutante in Komplex mit diesen Liganden kristallisiert und die Bindung näher inspiziert werden. Aufnahmeexperimente mit vier verschiedenen radioaktiv markierten Substraten in einem *B. subtilis* Stamm, der nur das evolvierte OpuB ABC Transportsystem besitzt, zeigten, dass einzig die Affinität (K_m) zum natürlichen OpuB-Substrat Cholin durch den Aminosäureaustausch drastisch verschlechtert wurde (100-fach) (Tabelle 14). Da allerdings die Transportkapazität (V_{max}) des Transporters nicht verringert wurde, scheint eine Osmoprotektion mit 1 mM Cholin, was ein starker

Überschuss im Vergleich zum natürlichen Habitat ist, immer noch möglich zu sein (Tabelle 14). Die *gbsR*-Deletion in diesem Stamm verändert, wie erwartet, nur die Geschwindigkeit des Transportes, da mehr Transportsysteme in dem Stamm produziert werden. Die gemessene Affinität wird durch die *gbsR*-Deletion nicht verändert. Durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im extrazellulären OpuBC SBP konnte das hoch spezifische OpuB Transportsystem zu einem promiskuitiven OpuC Transporter evolviert werden.

5.2 Der neuartige Osmolyt ABC Transporter OpuF

Die SBP-abhängigen ABC Transporter aus Gram Positiven Bakterien, wie z.B. OpuA, OpuB und OpuC aus *B. subtilis*, bestehen, wie bereits erwähnt, typischerweise aus zwei NBDs, zwei TMDs und einem SBP, welches über einen Lipidanker an die zytoplasmatischen Membran gebunden ist [42, 67, 71, 80, 81]. Über eine bioinformatische Studie, in der das Vorkommen der beiden ABC Transporter OpuB und OpuC in der Gattung *Bacillus* phylogenetisch analysiert wurde, konnte ein neuer Transportertyp für den Import von kompatiblen Soluten gefunden werden, OpuF. Dieser ABC Transporter besteht nur aus zwei Proteinen (OpuFA und OpuFB) und gehört zu den SBP-abhängigen Importern, in denen das SBP an die TMD anfusioniert ist [86]. Der neuartige OpuF Transporter ist in 58% der analysierten *Bacillus* Stämme vorhanden, wobei beachtet werden muss, dass nicht alle in dieser Analyse einbezogenen Stämme vollständig sequenziert sind (Abbildung 24). Die Verteilung von OpuF in dieser Gattung ist sehr gleichmäßig und der Transportertyp ist sogar weiter verbreitet, als der promiskuitive OpuC Transporter. Lediglich in den moderneren Stämmen ist dieser Transportertyp nicht mehr zu finden (Abbildung 24). Interessanterweise besitzen genau diese Stämme den hoch affinen ABC Transporter OpuB, was darauf hindeutet, dass die evolutionäre Etablierung von OpuB und dessen Co-Präsenz mit OpuC, die Notwendigkeit des Vorhandenseins von OpuF abgelöst hat. Zu dieser Gruppe gehört ebenfalls der, in dieser Arbeit als Modelorganismus genutzte Stamm, *B. subtilis*. Auch außerhalb der Gattung *Bacillus* (Ordnung Bacillales) konnten sehr viele Stämme mit einem OpuF-Transportertyp gefunden werden. In 689 untersuchten Stämmen wurden 485 OpuF-Typ ABC Transporter identifiziert (Abbildung 25). Bemerkenswerterweise besitzen alle *Listeria*- und *Staphylococcus* Stämme einen OpuF-Typ ABC Transporter. Dieses weite Vorkommen zeigt, dass dieser neuartige fusionierte ABC Transporter eine wichtige Rolle spielt, sogar in pathogenen Mikroorganismen.

Die kodierenden Gene *opuFA* und *opuFB* besitzen eine genetische Anordnung, die der Gene des Bile ABC Transporters aus *Listeria monocytogenes* [87] und OpuA aus *Lactococcus lactis* stark ähnelt [158, 159]. Das Gen *opuFA* kodiert hierbei für die ATPase. Eine Vorhersage der

transmembranen Helices lässt darauf schließen, dass das Gen *opuFB* für ein hybrides Protein kodiert, welches aus einer TMD und eine Substratbindedomäne besteht (Abbildung 26B). Der C-terminale Teil des hybriden Proteins befindet sich außerhalb der Zytoplasmamembran, was darauf hindeutet, dass dieser Teil das SBP bildet. Wie bereits für einige SBP gezeigt, [45, 115, 116, 123, 157, 159-163] erfolgt die Bindung der Liganden über eine Bindetasche, die aus aromatischen Aminosäuren besteht. In diesen „aromatic Cage“ können die Substrate über Kation- π -Interaktionen stabilisiert werden. Die typische aromatische Ligandenbindestelle ist sowohl in SBPs aus Bakterien [45, 115, 116, 159, 161, 162] als auch aus Archaeen [123, 157] zu finden. Außerdem ist bereits bekannt, dass dieser „aromatic cage“ zusammen mit weiteren Aminosäuren, die an der Bindung von Liganden beteiligt sind, bestimmen können, ob es sich um einen ABC Transporter mit spezifischer oder breiter Substratspezifität handelt. Ein Aminosäuresequenzvergleich der 112 OpuFB Proteine zeigte, dass in allen Substratbindedomänen der Proteine vier Aromaten konserviert sind (Abbildung 26A). In einem *in-silico* Model der Substratbindedomäne des OpuFB Proteins aus *B. infantis* wurde deutlich, dass diese konservierten aromatischen Aminosäuren eine sehr ähnliche Substratbindetasche formen, wie in bereits kristallisierten SBPs, wie z.B. OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* [115, 116] oder ProX aus dem hyperthermophilen Archaeon *A. fulgidus* (Abbildung 67) [123]. Die Substratbindedomäne des Proteins BileB diente zwar als Ausgangsstruktur des Modeling-Servers SWISS-model [133], allerdings besitzt Bile keine Transporteigenschaften für kompatible Solute [87, 139].

Die vorhergesagte Struktur von OpuF ist, wie auch in Bile aus *L. monocytogenes* und OpuA aus *L. lactis*, ein Homodimer [86]. Bei OpuF-ähnlichen ABC Transportern handelt es sich um Typ I ABC-Importer, die den Transport von osmo- und thermoprotektiven kompatiblen Soluten vermitteln [67]. Der fusionierte ABC Transporter OpuA aus *L. lactis* transportiert das am häufigsten genutzte kompatible Solut Glycin Betain [86]. Um zu überprüfen, ob die OpuF Transporter, welche in der Ordnung Bacillales in einer Vielzahl gefunden wurden, in der Lage sind, osmoprotektive Substanzen in die Zelle zu schleusen, wurden heterolog in *B. subtilis* Osmoprotektionsassays mit drei verschiedenen OpuF ABC Transportern (*B. megaterium*, *B. infantis*, *B. panaciterrae*) durchgeführt. Diese verdeutlichen, dass der OpuF-Typ Transporter tatsächlich in der Lage ist, den Transport von kompatiblen Soluten zu vermitteln (Abbildung 28). Das Substratspektrum ist allerdings nicht immer gleich. Während die getesteten OpuF Systeme aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* sehr eindeutig nur die Substrate Glycin Betain, Prolinbetain, Homobetain und das schwefelhaltige DMSP transportieren, kann das OpuF System aus *B. megaterium* zusätzlich γ -Butyrobetain transportieren (Abbildung 28). Obwohl

Crotonobetain und γ -Butyrobetain Vorstufen des Substrates Carnitin sind und alle drei osmoprotektive Eigenschaften besitzen, kann nur das kompatible Solut γ -Butyrobetain über den OpuF Transporter aus *B. megaterium* transportiert werden. Allerdings besitzt dieser Transporter nur eine niedrige Transporteffizienz (Tabelle 15, Abbildung 28), was möglicherweise durch ineffiziente Expression oder Translation im heterologen Stamm *B. subtilis* zu erklären ist. Die beiden OpuF Systeme aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* hingegen besitzen exakt das gleiche Substratspektrum (Abbildung 28) und eine sehr hohe Affinität zu Glycin Betain (Tabelle 15). Der K_m -Wert ist vergleichbar mit dem des ABC Transporters OpuC aus *B. subtilis* (Tabelle 15). Die Transportgeschwindigkeit der beiden OpuF Transporter ist fast doppelt so schnell verglichen zu OpuC (Tabelle 15). Die kinetischen Parameter und die sehr starke Verbreitung der *opuFA-opuFB* Gene lassen vermuten, dass dieser Transportertyp in der zellulären Stressantwort von terrestrischen sowie marinen Bakterien eine wichtige Rolle spielt. Im vorherigen Kapitel wurde die Bedeutung der Aminosäure an Position 74 der reifen SBPs OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* näher erläutert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Aspartat an dieser Stelle (OpuBC) zu einem spezifischen Substratspektrum, und ein Threonin (OpuCC) zu einem breiten Substratspektrum des ganzen ABC Transporters führt. Im Aminosäuresequenzvergleich der 112 OpuFB Proteine wurde deutlich, dass sich an der korrespondierenden Position des hybriden Proteins an dieser Stelle stets ein Threonin befindet. Dieses konservierte Threonin (Position 297 in OpuFB aus *B. megaterium*, Position 296 in OpuFB aus *B. infantis*, Position 299 in OpuFB aus *B. panaciterrae*) lässt vermuten, dass die untersuchten OpuF ABC Transporter ein vergleichbar breites Substratspektrum wie OpuC besitzen. Diese Hypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden (Abbildung 28). Es handelte sich, wie bereits erwähnt, allerdings auch nicht um ein spezifischen Transporter für Cholin. Es kann also in fusionierten SBP-TMD ABC Transportern keine Vorhersage getroffen werden, ob es sich um ein spezifischen oder promiskuitiven Importer handelt. Der Aminosäureaustausch dieses Threonins zu einem Aspartat führte allerdings dazu, dass keine kompatible Solute mehr zur Osmoprotektion transportiert werden konnten. Es ist möglich, dass das Aspartat tatsächlich, durch bereits in Kapitel 5.1 beschriebene Gründe, zur Einschränkung der Bindekapazität führt. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass das Protein aufgrund der Mutagenese nicht mehr korrekt gefaltet ist, dadurch keine Bindung mehr möglich ist. Für genauere Aussagen über die Bindung der kompatiblen Solute in der Substratbindedomäne der OpuFB Proteine müssten Bindestudien mit gereinigtem Protein durchgeführt und Kristallstrukturen mit Liganden erzeugt werden.

Alle Osmoprotektionsstudien wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit des *opuB*-Repressors GbsR durchgeführt. Da in dieser Arbeit, in einem Stamm mit ineffizienten hybriden ABC Transporter, Suppressormutationen in diesem Regulator gefunden wurden, die zur erhöhten Proteinsynthese des ABC Transporters führten, sollte auch in der Analyse zur Bestimmung der Substratspezifität der OpuF Transporter eine Deletion von GbsR zu deutlicheren Ergebnissen führen. In Anwesenheit von GbsR fand keine Osmoprotektion über die OpuF Transporter aus *B. infantis* und *B. panaciterrae* statt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese beiden ABC Transporter ebenfalls durch das Protein GbsR aus *B. subtilis* reguliert werden. Einzig im ineffizienten OpuF System aus *B. megaterium* war kein Einfluss von GbsR zu beobachten. Auf die nähere Regulation von GbsR auf die fusionierten ABC Transporter wurde in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

5.3 GbsR – Mutationen in verschiedenen Domänen des Repressors führen zur Derepression des *opuB* Operons

Mikroorganismen können auf wechselnde Bedingungen in ihrer Umgebung durch eine Kontrolle der Genexpression antworten [164]. Sowohl Prokaryoten, als auch Eukaryoten nutzen die transkriptionelle Regulation, in der häufig Aktivatoren und Repressoren eine Rolle spielen, sodass die Transkription entweder an- oder ausgeschaltet werden kann [165]. Die meisten transkriptionellen Regulatoren besitzen neben einer DNA-Bindedomäne eine Bindestelle für Effektormoleküle; chemische Signalmoleküle, die das metabolische Gleichgewicht der genetischen Maschinerie der Zelle fördern. Die Glycin Betain Synthese in *B. subtilis* wird durch den MarR-Typ Regulator GbsR reguliert, wobei Cholin als Induktor fungiert. Typisch für MarR-Typ Regulatoren ist das Helix-Turn-Helix Motiv, mit dem palindromische DNA Regionen gebunden werden können [38]. Befindet sich das Helix-Turn-Helix Motiv am C-Terminus, handelt es sich üblicherweise um Aktivatoren, liegt dieses Motiv am N-Terminus, wie im Falle von GbsR aus *B. subtilis*, ist der Regulator meist ein Repressor [166]. Die einfachste Form des Helix-Turn-Helix Motivs besteht aus zwei α -Helices, getrennt von einer β -Faltblattstruktur. Drei Aminosäuren bilden den Turn [167]. Bei der Bindung an palindromische DNA Regionen liegen MarR-Typ Regulatoren üblicherweise als Dimere vor. Wilkinson & Grove (2006) konnten zeigen, dass die Bindung durch Homodimere erfolgt. Da bereits bekannte kristallisierte MarR-Typ Regulatoren wie MepR aus *Staphylococcus aureus* [168] oder MarR aus *E. coli* [169] ebenfalls als Homodimere identifiziert wurden und auch das Protein Mj223 aus *M. jannaschii*, welches als Ausgangsstruktur für das GbsR *in-silico* Model diente, ein Homodimer ist [63], wird davon ausgegangen, dass GbsR aus *B. subtilis* ebenfalls

als Homodimer DNA bindet. Nau-Wagner *et al.* konnten in dem *in-silico* Modell von GbsR eine DNA-Bindedomäne, welche aus einer Winged-Helix-Turn-Helix Motiv besteht (AS 49-73), identifizieren (Abbildung 3B). Eine putative Dimerisierungsdomäne wird im Bereich von AS 95-161 vermutet. Zwischen beiden Domänen befindet sich der flexible Linker (AS 74 bis 94), in welchem sich zusätzlich eine putative Cholin-Bindebox aus vier Phenylalaninen (F⁹⁶, F⁹⁹, F¹⁰² und F¹⁰³) befindet. Laut Nau-Wagner *et al.* könnten diese vier Aromaten eine Ligandenbindetasche bilden [38]. M. Fischer konnte in ihrer Bachelorarbeit zeigen, dass diese vier aromatischen Aminosäuren, und zusätzlich noch zwei weitere Phenylalanine (F⁹⁵ und F⁹⁸) ebenfalls an der Substratbindung beteiligt sind.

Da Cholin nicht nur das Effektormolekül des transkriptionellen Repressors GbsR ist, sondern auch der Vorläufer für die, durch die Dehydrogenasen GbsA und GbsB katalysierte, Glycin-Betain Synthese und nicht *de-novo* synthetisiert werden kann, muss dieses Substrat über die ABC Transporter OpuB und OpuC aufgenommen werden [8, 37]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass GbsR die *gbsAB* Expression und die *opuB* Expression durch Wechselwirkungen mit der DNA reprimiert. Die Bindestelle für GbsR liegt in beiden Fällen zwischen dem Promotorbereich und der Ribosomenbindestelle, was zu einem „Road-Block“ Mechanismus führt (persönliche Mitteilung Bianca Warmbold, unveröffentlicht). Die Polymerase kann zwar an den Promotor binden, allerdings wird das Ablesen der Gene verhindert. OpuC hingegen wird nicht durch GbsR reguliert, was physiologisch sinnvoll ist, da OpuC ein breites Substratspektrum hat, während OpuB ein spezifischer Importer für Cholin ist. In Anwesenheit des Induktors Cholin, welcher mit einer K_d von 165 μ M an das Protein bindet, löst sich der Repressor von der DNA und die Expression von *gbsAB* und *opuB* wird induziert [38]. Hierbei gibt es vermutlich eine derartige Konformationsänderung des Homodimers, sodass die DNA-Bindemotive nicht mehr an die DNA binden können. Diese Dynamik des Regulators GbsR konnte bisher noch nicht eindeutig untersucht werden, da das gereinigte GbsR Protein biochemisch sehr schwer zu handhaben ist.

Um die verschiedenen Domänen von GbsR besser zu verstehen und deren Funktion zu studieren, wurden, gefunden durch einen Suppressor-Screen, Mutationen charakterisiert, die sich in der putativen Cholin Bindebox, dem flexiblen Linker und im Winged-Helix-Turn-Helix Motiv befinden [46]. Dieser Suppressor-Screen wurde mit einem *B. subtilis* Stamm durchgeführt, welcher den ineffizienten hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC besitzt (Abbildung 11, 30). Mutationen im *opuB* Repressor GbsR waren durchaus denkbar, da sich herausstellte, dass die Menge des OpuB::OpuCC Transporters nicht für eine optimale Osmoprotektion ausreicht. Demnach führten alle gefundenen Mutationen, ob Aminosäure-

austausch, „frame-shift“-Mutation oder eine große Deletion von 253 bp zu einer verbesserten Protektion unter hyperosmotischen Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Basenaustausch gefunden, welcher sich 15 bp vor dem Startcodon und zwei bp vor der Ribosomenbindestelle befindet. Diese Mutation könnte Auswirkungen auf die Bindung des Ribosoms an die DNA haben, sodass die mRNA nicht effizient translatiert werden kann, denn alle gefundenen Mutationen führen zu einer erhöhten Proteinsynthese des Transporters OpuB::OpuCC, was mittels Western Blot gezeigt werden konnte (Abbildung 36). Zusätzlich konnte durch die Bestimmung der kinetischen Parameter von repräsentativen Mutationen gezeigt werden, dass die Transportkapazität von Glycin Betain durch den hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC gesteigert wurde (Tabelle 16). Auch die Auswirkungen der GbsR-Mutanten auf die *gbsAB*-Expression wurden analysiert. In Anwesenheit vom GbsR_{wt} Protein ist nur eine Basisexpression von *gbsA* vorhanden. Wenn der Induktor Cholin zugegeben wird und die Osmolarität auf 0.4 M NaCl erhöht wird, um die Expression der Importsysteme OpuB und OpuC zu gewährleisten, wird *gbsA* exprimiert. In Abwesenheit des Repressors GbsR war bereits ohne Cholin die Expression auf gleichem Level wie mit Cholin. Es konnte hiermit reproduziert werden, dass GbsR die Expression von *gbsA* beeinflusst. Verglichen zur Wildtyp Situation zeigen mit Ausnahme von zwei Mutanten (GbsR-S⁶²N und GbsR-D⁵⁰Y), alle Mutanten eine erhöhte Expression von *gbsA* ohne das Effektormolekül Cholin. Vier der neun Punktmutanten verhielten sich wie eine GbsR Deletionsmutante, sodass ein „loss-of-function“ beobachtet werden kann (Abbildung 38). Die Funktionalität von GbsR als Repressor für *gbsA* ist komplett verloren gegangen. Drei Punktmutanten, welche sich alle im flexiblen Linker des Proteins befinden, zeigten nur eine erhöhte Expression im uninduzierten Zustand. Eine Cholin-Induktion war aber noch möglich, sodass diese Mutanten nur die Repression verschlechtern. Scheinbar führen all diese Mutationen, selbst die in der putativen Cholin Bindebox, zu einem derartigen Konformationswechsel des Proteins, sodass eine DNA-Bindung nicht mehr möglich ist. Denkbar ist, dass eine korrekte Bildung des Homodimers gar nicht erst möglich ist. Die DNA-Erkennungsmotive der beiden Monomere passen möglicherweise nicht mehr auf die DNA, sodass eine Repression nicht, oder nur teilweise möglich ist. Dies konnte auch durch EMSA-Studien von repräsentativen Mutanten gezeigt werden. Die Proteine zeigen keinerlei Bindung mehr zur GbsR-Bindestelle vor *gbsA* (Abbildung 37). Eine Überprüfung, ob die GbsR Mutanten richtig gefaltet und als Dimere vorliegen, muss allerdings noch durch Gelfiltration erfolgen. Die Mutation GbsR-S⁶²N, welche sich direkt in der DNA-Bindedomäne befindet, führt zur minimal erhöhten Expression von *gbsA* in Abwesenheit von Cholin. Denkbar wäre, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die Konformationsänderung und Proteindynamik von GbsR hat,

sondern nur auf die direkte DNA-Bindung und hierbei ein Aminosäureaustausch keinen starken Einfluss. Auch EMSA-Studien mit dieser Mutante konnten beweisen, dass eine Bindung zur DNA noch möglich war, diese aber eingeschränkt war. Der Einfluss der Mutation GbsR-D⁵⁰Y auf die *gbsA* Expression muss wiederholt werden, da diese bisher keine Aktivität des *gbsA*-Promotors zeigt. Ein „Superrepressor“ würde allerdings wenig Sinn machen, da der Suppressor-Screen darauf basiert, dass die Expression und Translation von *opuB* erhöht werden sollte und somit eine DNA-Bindung von GbsR verschlechtert werden müsste. Eine erhöhte Transportermenge sowie Transportkapazität konnte für diese Mutante bereits gezeigt werden. Weiterhin würde die Bestimmung der Bindeaffinitäten (K_d) der gefundenen GbsR-Mutanten zum natürlichen Induktor Cholin Aufschlüsse über die Auswirkungen der Mutationen geben. Durch den bereits beschriebenen Suppressor-Screen konnte wertvolles Wissen über den Zusammenhang zwischen Struktur- und Funktionalität des Repressors GbsR erstmals erlangt werden. Ray *et al.* konnten bereits vorhersagen, dass der Homodimers des DNA-Bindeproteins Mj223 aus *M. jannaschii* eine Konformationsänderung vornehmen muss, um überhaupt DNA binden zu können. Ohne diese Proteindynamik würden das Winged-Helix-Turn-Helix Motiv strukturell keine Wechselwirkung mit DNA eingehen können. Mj223 aus *M. jannaschii* und GbsR aus *B. subtilis* besitzen eine 34% ige Sequenzidentität. Da diese Struktur zusätzlich als Ausgangssequenz für das *in-silico* Model von GbsR diene, liegt es nahe, dass auch in GbsR aus *B. subtilis* die Konformationsänderung bei der DNA-Bindung von Nöten ist. Interessanterweise führen Mutationen, welche sich direkt im DNA-Bindemotiv liegen, nicht zu einer vollständigen „loss-of-function“ von GbsR (Abbildung 38). Hierbei wird deutlich, dass andere Regionen, wie der flexible Linker oder die Cholin-Bindestelle einen erheblich stärkeren Einfluss auf die DNA-Bindung haben. Da diese Aminosäuren aber keinen direkten Kontakt zur DNA haben, liegt es nahe, dass diese Bereiche, besonders die Linkerregion, einen Beitrag bei der Proteindynamik leisten und die Bindung zu DNA durch einen weitreichenden Effekt gestört wird. Die Regulation der Glycin-Betain Synthese über den MarR-Typ Regulator GbsR konnte durch die stückweise Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktionalität von GbsR weiter vertieft werden.

5.4 Der Mechanismus der Osmoprotektion mit Hilfe des Cholin-Derivats Homocholin

Wie bereits erwähnt, wird das *opuC* Operon nicht durch den Repressor GbsR reguliert. Der promiskuitive ABC Transporter OpuC ist nämlich in der Lage nicht nur Cholin als Vorläufer der Glycin Betain Synthese, sondern eine große Vielzahl von verschiedensten kompatiblen

Soluten bei osmotischem Stress in die Zelle zu transportieren [8, 9, 37]. Natürlich vorkommende Substrate, wie z.B. Glycin Betain, Cholin, Carnitin oder Homobetain sowie synthetische Substrate, wie Derivate von DMSP oder Glycin Betain können vom SBP des OpuC Transporters gebunden und aufgenommen werden [43, 44]. Hierfür kann die osmotische Induzierbarkeit des *opuC* Operons genutzt werden [7]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch das Cholin-Derivat Homocholin osmoprotektive Eigenschaften in *B. subtilis* besitzt und dessen Transport über den promiskuitiven OpuC Transporter vermittelt wird. Dieses Substrat besitzt eine zusätzliche CH₂-Gruppe in der Kohlenstoffkette als Cholin und kommt im Gehirn von Säugetieren vor. Hier kann Homocholin zu Acetylhomocholin acetyliert werden und dient dann als Neurotransmitter [170]. Als synthetisch hergestelltes Molekül spielt es eine große Rolle in der medizinischen Forschung [145, 146, 148, 170]. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Glycin Betain Derivat Homobetain in *B. subtilis* osmoprotektive Eigenschaften hat. Es konnte demnach vermutet werden, dass dies für Homocholin auch der Fall sein könnte. Außerdem sollte untersucht werden, ob Homocholin, wie auch Cholin in zwei Schritten zu Homobetain oxidiert werden muss, um *B. subtilis* vor Salzstress zu schützen. Hierbei steht die Promiskuität der Dehydrogenasen GbsA und GbsB im Fokus.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cholin-Derivat Homocholin über die beiden nah verwandten ABC Transporter OpuB und OpuC transportiert werden kann (Abbildung 41, 42, Tabelle 17). Die Affinität des OpuC Systems zu diesem Substrat ist vergleichbar mit der zu Cholin. Im OpuB System sinkt die Affinität um das 36-fache (Tabelle 17). Vermutlich stört die verlängerte Kohlenstoffkette im OpuBC SBP, da durch das Aspartat⁷⁴, welches bei der Substratdetermination eine essentielle Rolle spielt, weniger Volumen für die Liganden zu Verfügung steht also das Threonin⁷⁴ im OpuCC SBP (Abbildung 44). Interessanterweise ist eine Umwandlung von Homocholin zu Homobetain notwendig, um *B. subtilis* bei osmotischem Stress Schutz zu bieten. Durch intrazelluläre Poolmessung konnte gezeigt werden, dass Homocholin fast vollständig zu Homobetain oxidiert wird (Abbildung 49). Eine Deletion der Gene *gbsA* und *gbsB* führt dazu, dass das Bakterium unter Hochsalzbedingungen in Anwesenheit von Homocholin nicht wachsen kann. Zusätzlich wird durch die Akkumulation von Homocholin in der Zelle die Prolinbiosynthese negativ beeinflusst (Abbildung 46). Diese würde normalerweise angeschaltet, sobald keine osmotischen Schutzsubstanzen in der Umgebung vorliegen, um den Organismus mit der *de-novo* Synthese eines kompatiblen Soluts zu schützen [9, 51, 52]. Möglicherweise wird durch die positiv geladene Trimethylammonium-Kopfgruppe der intrazelluläre Ionenhaushalt gestört, sodass Prozesse, wie die Proteinbio-

synthese bei der die Interaktion der RNA-Polymerase mit der DNA essentiell ist oder die Prolinbiosynthese gestört sein könnten.

Erstaunlicherweise sind die NAD-abhängige Alkohol Dehydrogenase GbsB und die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase GbsA in der Lage, nicht nur Cholin in zwei Schritten zu Glycin Betain zu oxidieren, sondern auch Homocholin zu Homobetain umzuwandeln. Hoffmann et al. konnten vor kurzem zeigen, dass ein Arsenhaltiges Derivat von Cholin, Arsenocholin, in *B. subtilis* ebenfalls über die Glycin Betain Synthese Enzyme GbsB und GbsA zu Arsenobetain oxidiert wird. Arsenobetain wurde hier nicht nur als Osmoprotektivum beschrieben. Es bietet zusätzlich Schutz gegenüber sehr niedrigen und sehr hohen Temperaturen [171]. Enzyme, welche zusätzlich zu ihrer natürlichen Funktion im Organismus weitere womöglich fremde Prozesse katalysieren können, sind nicht selten. Durch diese Multifunktionalität entsteht ein „Untergrundmetabolismus“, welcher wichtig bei der Entwicklung neuer Stoffwechselwege im Laufe der Evolution ist. Beispielsweise konnte durch das Einfügen der zwei Enzyme *pdxH* und *pdxJ* aus *E. coli* in einen *B. subtilis* Stamm ein DXP-abhängiger PLP Syntheseweg etabliert werden [172]. Diese Methode könnte bei der Generierung von Synthesen nützlicher Substanzen von Vorteil sein [172]. Das Potential der Evolution neue Enzyme zu erhalten, beruht auf der Vielfalt von Enzymen in einem Organismus, der Topologie von metabolischen Netzwerken und den Bedingungen in der Umwelt. Promiskuitive Enzyme können dem Organismus dann einen Vorteil bieten, wenn z.B. neue Nährstoff- und Energiequellen genutzt werden sollen [173]. Vermutlich waren die evolutionär frühesten Enzyme Generalisten mit einer sehr breiten Substratspezifität und erst im Laufe von Milliarden Jahren konnten spezifizierte und hoch affine Enzyme oder Aufnahmesysteme ein effizientes Überleben in Nischen mit limitierten Nährstoffgehalten [173]. Bei der Evolution neuer Systeme spielt die Duplikation von Genen eine große Rolle [174].

Bei der Regulation der Cholin-zu-Glycin Betain Synthese spielt der MarR-Typ Regulator GbsR eine wichtige Rolle, da erst in Anwesenheit von Cholin die Gene *gbsAB* und *opuB* exprimiert werden [38, 54]. Wie bereits in Kapitel 5.3 erläutert, gibt es eine aromatische Bindetasche, welche die stabile Bindung des Trimethylammonium Substrates Cholin ermöglicht. Wenn Cholin vorliegt, wird demnach stets die Umwandlung zu Glycin Betain über GbsA und GbsB induziert. Homocholin scheint strukturell nicht in die Bindetasche von GbsR zu passen, da in Anwesenheit von GbsR keine Oxidation von Homocholin zu Homobetain möglich ist. Das Arsenderivat Arsenocholin konnte von GbsR gebunden werden, allerdings mit einer schlechteren Affinität als Cholin [171]. Hierbei handelt es sich aber nicht um ein strukturell längeres Molekül, da sich in diesem Derivat ein Arsen anstelle des Stickstoffmoleküls befindet.

Vermutlich ist Homocholin für die Funktionalität als Induktor für GbsR strukturell zu lang. Um einem *B. subtilis* Wildtyp Stamm eine Osmoprotektion mit dem Substrat Homocholin zu bieten, müsste eine Mutation identifiziert werden, welche eine Homocholinbindung an den *gbsAB* Repressor GbsR ermöglicht. Um diese zu finden, wurde ein genetischer Screen entwickelt. Hierbei wurde ein Blau-Weiß Test genutzt, der mit Hilfe einer *gbsA-lacZ* Reportergenfusion verschiedene Phänotypen zeigte, welche von *gbsR* Genvarianten resultierten (Abbildung 50). Hierbei konnte in zwei unabhängigen Klonen die Mutation GbsR-T⁸⁸A identifiziert werden. Diese Mutation befindet sich in der flexiblen Linkerregion, welche die Dimerisierungsdomäne und das DNA-Bindemotiv verbindet. Nur sechs Aminosäuren entfernt beginnt die aromatische Bindetasche für den natürlichen Induktor Cholin. Eine Messung der Promotoraktivität von *gbsA* bei moderaten Salzkonzentration und in Anwesenheit von Homocholin ergab für diese GbsR Mutante eine erhöhte Expression (Abbildung 52). War kein Induktor vorhanden, so konnte auch keine LacZ-Aktivität gemessen werden. Wurde das natürliche Effektormolekül Cholin zugegeben, war die Aktivität etwa doppelt so hoch, wie mit dem Cholin-Derivat Homocholin (Abbildung 52). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Induktion und somit Bindung von Homocholin an die Mutante GbsR-T⁸⁸A möglich sein muss. Zwar scheint diese Bindung, verglichen zur Cholinbindung, erheblich schlechter zu sein, aber da ohne Homocholin oder Cholin keine *gbsA* Expression vorhanden ist, hat das Substrat Homocholin eindeutig eine Auswirkung auf die GbsR-DNA Interaktion. Dass die Bindung von Homocholin nicht sehr effizient ist, konnte auch in einem Wachstumsversuch unter hochosmolaren Bedingungen gezeigt werden. Wurde hier der Stamm, welcher die GbsR-T⁸⁸A Mutante besitzt, in Anwesenheit von 1 mM Homocholin kultiviert, so konnte kein protektives Wachstum beobachtet werden (Abbildung 53). Möglicherweise kann mit dem physiologischen Überschuss von 1 mM Homocholin eine totale Umwandlung zu Homobetain nicht erfolgen, da die Expression von *gbsAB* nicht hoch genug ist. Demnach gibt es weiterhin einen Überschuss der positiven Ladung im Cytoplasma, sodass zelluläre Prozesse möglicherweise nicht korrekt ablaufen [17]. Obwohl sich die Mutation nicht direkt in der Bindetasche befindet, kann vermutet werden, dass der flexible Loop in Richtung der Bindebox klappt und dort eine Auswirkung auf das Volumen der Bindetasche hat. Da es sich bei der Struktur von GbsR nur um ein *in-silico* berechnetes Modell handelt, ist nicht auszuschließen, dass es zur tatsächlichen Kristallstruktur Unterschiede gibt. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Blau-Weiß Screens 80 unabhängige Klone hinsichtlich der *gbsA* Expression untersucht. Um weitere Mutationen zu identifizieren, welche womöglich eine mit Cholin vergleichbare Induktion des *gbsAB* Operons hervorrufen, müssten viele weitere Klone untersucht werden. Der in dieser Arbeit entwickelte

Screen bietet hierfür die Basis. Um die Funktionalitäten der verschiedenen Domänen von GbsR eindeutig zu bestimmen, ist außerdem die Kristallisation des Proteins zwingend notwendig.

6. Literatur

1. **Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R et al:** 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of biotechnology* 2017, **261**:169-176.
2. **Galinski EA, Trüper HG:** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS microbiology reviews* 1994, **15**:95-108.
3. **Wood JM:** Osmosensing by Bacteria: Signals and membrane-based sensors. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 1999, **63**(1):230-262.
4. **Csonka LN, Hanson AD:** Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annual review of microbiology* 1991, **45**:569-606.
5. **Roberts MF:** Microorganisms. *Saline systems* 2005, **30**:1-30.
6. **Booth IR, Edwards MD, Black S, Schumann U, Miller S:** Mechanosensitive channels in Bacteria: Signs of closure? *Nature reviews Microbiology* 2007, **5**(6):431-440.
7. **Bremer E, Krämer R:** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Bacterial stress response. G. Storz & Hengge-Aronis, Washington DC, USA: *ASM Press* 2000:79-97.
8. **Kempf B, Bremer E:** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology* 1998, **170**(5):319-330.
9. **Hoffmann T, Bremer E:** Guardians in a stressful world: The Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. *Biological chemistry* 2017, **398**(2):193-214.
10. **Earl AM, Losick R, Kolter R:** Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology* 2008, **16**(6):269-275.
11. **Hartig E, Jahn D:** Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in microbial physiology* 2012, **61**:195-216.
12. **Takamatsu H, Watabe K:** Assembly and genetics of spore protective structures. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2002, **59**(3):434-444.
13. **Hecker M, Schumann W, Völker U:** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 1996, **19**(3):417-428.
14. **Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E:** Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: Physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**(8):2454-2460.
15. **Gundlach J, Herzberg C, Kaever V, Gunka K, Hoffmann T, Weiss M, Gibhardt J, Thurmer A, Hertel D, Daniel R et al:** Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-Amp in *Bacillus subtilis*. *Science signaling* 2017, **10**(475).
16. **Ventosa A, Nieto JJ, Oren A:** Biology of moderately halophilic aerobic Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 1998, **62**(2):504-544.
17. **Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN:** Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 1982, **217**(4566):1214-1222.

18. **Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, Bremer E:** KtrAB and KtrCD: Two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of bacteriology* 2003, **185**(4):1289-1298.
19. **Krulwich TA, Ito M, Guffanti AA:** The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochimica et biophysica acta* 2001, **1505**(1):158-168.
20. **da Costa MS, Santos H, Galinski EA:** An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 1998, **61**:117-153.
21. **Galinski EA:** Compatible solutes of halophilic euBacteria: Molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* 1993, **49**:487-496.
22. **Csonka LN:** Physiological and genetic responses of Bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* 1989, **53**(1):121-147.
23. **Brown AD, Simpson JR:** Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *Journal of general microbiology* 1972, **72**(3):589-591.
24. **Yancey PH:** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of experimental biology* 2005, **208**(Pt 15):2819-2830.
25. **Holtmann G, Bremer E:** Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: Involvement of opu transporters. *Journal of bacteriology* 2004, **186**(6):1683-1693.
26. **Hoffmann T, Bremer E:** Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *Journal of bacteriology* 2011, **193**(7):1552-1562.
27. **Brigulla M, Hoffmann T, Krisp A, Volker A, Bremer E, Völker U:** Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *Journal of bacteriology* 2003, **185**(15):4305-4314.
28. **Knapp S, Ladenstein R, Galinski EA:** Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles: life under extreme conditions* 1999, **3**(3):191-198.
29. **Street TO, Bolen DW, Rose GD:** A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(38):13997-14002.
30. **Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D, Goloubinoff P:** Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(43):39586-39591.
31. **Bashir A, Hoffmann T, Kempf B, Xie X, Smits SH, Bremer E:** Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonidine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 2014, **160**(Pt 10):2283-2294.
32. **Courtenay ES, Capp MW, Anderson CF, Record MT, Jr.:** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: Implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. *Biochemistry* 2000, **39**(15):4455-4471.
33. **Rösser M, Müller V:** Osmoadaptation in Bacteria and Archaea: Common principles and differences. *Environmental microbiology* 2001, **3**(12):743-754.

34. **Rhodes D, Hanson AD**: Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993, **44**:357-384.
35. **Kempf B, Bremer E**: OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(28):16701-16713.
36. **Kappes RM, Kempf B, Bremer E**: Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *Journal of bacteriology* 1996, **178**(17):5071-5079.
37. **Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, Bremer E**: Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 1999, **32**(1):203-216.
38. **Nau-Wagner G, Oppen D, Rolbetzki A, Boch J, Kempf B, Hoffmann T, Bremer E**: Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine-responsive GbsR repressor. *Journal of bacteriology* 2012, **194**(10):2703-2714.
39. **Welsh DT**: Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews* 2000, **24**(3):263-290.
40. **Horn C, Jenewein S, Sohn-Bosser L, Bremer E, Schmitt L**: Biochemical and structural analysis of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuA and its isolated subunits. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2005, **10**(2-4):76-91.
41. **von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E**: Osmostress response in *Bacillus subtilis*: Characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor Sigma B. *Molecular microbiology* 1997, **25**(1):175-187.
42. **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J**: Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 2008, **72**(2):317-364, table of contents.
43. **Bashir A, Hoffmann T, Smits SH, Bremer E**: Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* 2014, **80**(9):2773-2785.
44. **Broy S, Chen C, Hoffmann T, Brock NL, Nau-Wagner G, Jebbar M, Smits SH, Dickschat JS, Bremer E**: Abiotic stress protection by ecologically abundant dimethylsulfoniopropionate and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology* 2014.
45. **Smits SH, Hoing M, Lecher J, Jebbar M, Schmitt L, Bremer E**: The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies. *Journal of bacteriology* 2008, **190**(16):5663-5671.
47. **Bremer E**: Adaptation to changing osmolarity. In "*Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells", ED.: AL Sonnenschein RM Losick & JA Hoch, Washington DC, USA: *ASM Press* 2001:385-391.
48. **Teichmann L, Chen C, Hoffmann T, Smits SHJ, Schmitt L, Bremer E**: From substrate specificity to promiscuity: hybrid ABC transporters for osmoprotectants. *Molecular microbiology* 2017, **104**(5):761-780.

49. **Brill J, Hoffmann T, Putzer H, Bremer E:** T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 2011, **157**(Pt 4):977-987.
50. **Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL:** Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 2001, **183**(14):4389-4392.
51. **Hoffmann T, Bleisteiner M, Sappa PK, Steil L, Mäder U, Völker U, Bremer E:** Synthesis of the compatible solute proline by *Bacillus subtilis*: Point mutations rendering the osmotically controlled *proHJ* promoter hyperactive. *Environmental microbiology* 2017, **19**(9):3700-3720.
52. **Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E:** Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of bacteriology* 2011, **193**(19):5335-5346.
53. **Boch J, Kempf B, Bremer E:** Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of bacteriology* 1994, **176**(17):5364-5371.
54. **Boch J, Kempf B, Schmid R, Bremer E:** Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *gbsAB* genes. *Journal of bacteriology* 1996, **178**(17):5121-5129.
55. **Boch J, Nau-Wagner G, Kneip S, Bremer E:** Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Archives of microbiology* 1997, **168**(4):282-289.
56. **Kimura Y, Kawasaki S, Yoshimoto H, Takegawa K:** Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology* 2010, **192**(5):1467-1470.
57. **Nyysola A, Kerovuo J, Kaukinen P, von Weymarn N, Reinikainen T:** Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(29):22196-22201.
58. **Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T et al:** Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(5):1318-1323.
59. **Ronzheimer S:** GbsR-typ Regulatoren: Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie von transkriptionellen Repressoren. *Philipps-Universität Marburg* 2015, Dissertation.
60. **Wilkinson SP, Grove A:** Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current issues in molecular biology* 2006, **8**(1):51-62.
61. **Alekshun MN, Levy SB:** Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The *mar* regulon. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997, **41**(10):2067-2075.
62. **Martin RG, Rosner JL:** Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(12):5456-5460.

63. **Ray SS, Bonanno JB, Chen H, de Lencastre H, Wu S, Tomasz A, Burley SK:** X-ray structure of an *M. jannaschii* DNA-binding protein: Implications for antibiotic resistance in *S. aureus*. *Proteins* 2003, **50**(1):170-173.
64. **Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD et al:** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 1996, **273**(5278):1058-1073.
65. **Gajiwala KS, Burley SK:** Winged helix proteins. *Current opinion in structural biology* 2000, **10**(1):110-116.
66. **Lewinson O, Livnat-Levanon N:** Mechanism of action of ABC importers: Conservation, divergence, and physiological adaptations. *Journal of molecular biology* 2017, **429**(5):606-619.
67. **ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ:** Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of general physiology* 2014, **143**(4):419-435.
68. **Higgins CF:** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 1992, **8**:67-113.
69. **Eitinger T, Rodionov DA, Grote M, Schneider E:** Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS microbiology reviews* 2011, **35**(1):3-67.
70. **Schneider E, Eckey V, Weidlich D, Wiesemann N, Vahedi-Faridi A, Thaben P, Saenger W:** Receptor-transporter interactions of canonical ATP-binding cassette import systems in prokaryotes. *European Journal of cell biology* 2012, **91**(4):311-317.
71. **Locher KP:** Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature structural & molecular biology* 2016, **23**(6):487-493.
72. **Bulut H, Moniot S, Licht A, Scheffel F, Gathmann S, Saenger W, Schneider E:** Crystal structures of two solute receptors for L-cystine and L-cysteine, respectively, of the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of molecular biology* 2012, **415**(3):560-572.
73. **Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B:** ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS letters* 2006, **580**(4):1023-1035.
74. **Schmitt L, Tampe R:** Structure and mechanism of ABC transporters. *Current opinion in structural biology* 2002, **12**(6):754-760.
75. **Cui J, Davidson AL:** ABC solute importers in Bacteria. *Essays in biochemistry* 2011, **50**(1):85-99.
76. **Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD:** ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(2):147-156.
77. **Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M:** ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2016, **26**:1-9.
78. **Prasad R, Goffeau A:** Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annual review of microbiology* 2012, **66**:39-63.
79. **Wolf A, Bauer B, Hartz AM:** ABC transporters and the alzheimer's disease enigma. *Frontiers in psychiatry* 2012, **3**:54.

80. **Patzlaff JS, van der Heide T, Poolman B:** The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(32):29546-29551.
81. **Oswald C, Holland IB, Schmitt L:** The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2006, **372**(6):385-399.
82. **Oldham ML, Chen J:** Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* 2011, **332**(6034):1202-1205.
83. **Oldham ML, Khare D, Quijcho FA, Davidson AL, Chen J:** Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* 2007, **450**(7169):515-521.
84. **Berntsson RP, Smits SH, Schmitt L, Slotboom DJ, Poolman B:** A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS letters* 2010, **584**(12):2606-2617.
85. **Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP:** Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology* 2007, **17**(4):412-418.
86. **van der Heide T, Poolman B:** Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(13):7102-7106.
87. **Ruiz S, Schuurman-Wolters G, Poolman B:** Crystal structure of the substrate-binding domain from *Listeria monocytogenes* Bile-resistance determinant Bile. *Crystals* 2016, **6**:162.
88. **Gouridis G, Schuurman-Wolters GK, Ploetz E, Husada F, Vietrov R, de Boer M, Cordes T, Poolman B:** Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ. *Nature structural & molecular biology* 2015, **22**(1):57-64.
89. **Oldham ML, Chen S, Chen J:** Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(45):18132-18137.
90. **Boos W, Shuman H:** Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 1998, **62**(1):204-229.
91. **Rees DC, Johnson E, Lewinson O:** ABC transporters: The power to change. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(3):218-227.
92. **Daus ML, Berendt S, Wuttge S, Schneider E:** Maltose binding protein (MalE) interacts with periplasmic loops P2 and P1 respectively of the MalFG subunits of the maltose ATP binding cassette transporter (MalFGK₂) from *Escherichia coli*/*Salmonella* during the transport cycle. *Molecular microbiology* 2007, **66**(5):1107-1122.
93. **Bordignon E, Grote M, Schneider E:** The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century-towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Molecular microbiology* 2010, **77**(6):1354-1366.
94. **Orelle C, Alvarez FJ, Oldham ML, Orelle A, Wiley TE, Chen J, Davidson AL:** Dynamics of alpha-helical subdomain rotation in the intact maltose ATP-binding cassette transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(47):20293-20298.

95. **Khare D, Oldham ML, Orelle C, Davidson AL, Chen J:** Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Molecular cell* 2009, **33**(4):528-536.
96. **Chen J:** Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Current opinion in structural biology* 2013, **23**(4):492-498.
97. **Chen S, Oldham ML, Davidson AL, Chen J:** Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2013, **499**(7458):364-368.
98. **Locher KP, Borths E:** ABC transporter architecture and mechanism: Implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS letters* 2004, **564**(3):264-268.
99. **Korkhov VM, Mireku SA, Locher KP:** Structure of AMP-PNP-bound vitamin B₁₂ transporter BtuCD-F. *Nature* 2012, **490**(7420):367-372.
100. **Mireku SA, Ruetz M, Zhou T, Korkhov VM, Krautler B, Locher KP:** Conformational change of a tryptophan residue in BtuF facilitates binding and transport of cobinamide by the vitamin B₁₂ transporter BtuCD-F. *Scientific reports* 2017, **7**:41575.
101. **Hvorup RN, Goetz BA, Niederer M, Hollenstein K, Perozo E, Locher KP:** Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* 2007, **317**(5843):1387-1390.
102. **Scheepers GH, Lycklama ANJA, Poolman B:** An updated structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS letters* 2016, **590**(23):4393-4401.
103. **Quioco FA, Ledvina PS:** Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Molecular microbiology* 1996, **20**(1):17-25.
104. **Tang C, Schwieters CD, Clore GM:** Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* 2007, **449**(7165):1078-1082.
105. **Mao B, Pear MR, McCammon JA, Quioco FA:** Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-Flytrap" model. *The Journal of biological chemistry* 1982, **257**(3):1131-1133.
106. **Grote M, Polyhach Y, Jeschke G, Steinhoff HJ, Schneider E, Bordignon E:** Transmembrane signaling in the maltose ABC transporter MalFGK2-e: Periplasmic MalF-p2 loop communicates substrate availability to the ATP-bound MalK dimer. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(26):17521-17526.
107. **Alvarez FJ, Orelle C, Huang Y, Bajaj R, Everly RM, Klug CS, Davidson AL:** Full engagement of liganded maltose-binding protein stabilizes a semi-open ATP-binding cassette dimer in the maltose transporter. *Molecular microbiology* 2015, **98**(5):878-894.
108. **Rice AJ, Park A, Pinkett HW:** Diversity in ABC transporters: Type I, II and III importers. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2014, **49**(5):426-437.
109. **Shilton BH:** The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: A prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. *Biochimica et biophysica acta* 2008, **1778**(9):1772-1780.
110. **Russell RR, Aduse-Opoku J, Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ:** A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(7):4631-4637.

111. **Berntsson RP, Doeven MK, Fusetti F, Duurkens RH, Sengupta D, Marrink SJ, Thunnissen AM, Poolman B, Slotboom DJ:** The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA. *The EMBO Journal* 2009, **28**(9):1332-1340.
112. **Higgins CF, Ames GF:** Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, **78**(10):6038-6042.
113. **Quentin Y, Fichant G, Denizot F:** Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *Journal of molecular biology* 1999, **287**(3):467-484.
114. **Cosquer A, Ficamos M, Jebbar M, Corbel JC, Choquet G, Fontenelle C, Uriac P, BeRNard T:** Antibacterial activity of glycine betaine analogues: Involvement of osmoporters. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2004, **14**(9):2061-2065.
115. **Du Y, Shi WW, He YX, Yang YH, Zhou CZ, Chen Y:** Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *The Biochemical Journal* 2011, **436**(2):283-289.
116. **Pittelkow M, Tschapek B, Smits SH, Schmitt L, Bremer E:** The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *Journal of molecular biology* 2011, **411**(1):53-67.
117. **Dougherty DA:** Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 1996, **271**(5246):163-168.
118. **Mahadevi AS, Sastry GN:** Cation- π interaction: Its role and relevance in chemistry, biology, and material science. *Chemical reviews* 2013, **113**(3):2100-2138.
119. **Ma JC, Dougherty DA:** The cation-minus sign- π interaction. *Chemical reviews* 1997, **97**(5):1303-1324.
120. **Jacobs SA, Khorasanizadeh S:** Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone h3 tail. *Science* 2002, **295**(5562):2080-2083.
121. **Cheng J, Goldstein R, Gershenson A, Stec B, Roberts MF:** The cation- π box is a specific phosphatidylcholine membrane targeting motif. *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(21):14863-14873.
122. **Dougherty DA, Stauffer DA:** Acetylcholine binding by a synthetic receptor: Implications for biological recognition. *Science* 1990, **250**(4987):1558-1560.
123. **Schiefner A, Holtmann G, Diederichs K, Welte W, Bremer E:** Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(46):48270-48281.
124. **Spizizen J:** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1958, **44**(10):1072-1078.
125. **Sambrook J, Russell DW:** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor laboratory Press* 2001.
126. **Gotsche S, Dahl MK:** Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of bacteriology* 1995, **177**(10):2721-2726.

127. **Schöck F, Gotsche S, Dahl MK:** Vectors using the phospho-alpha-(1,1)-glucosidase-encoding gene *TreA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* 1996, **170**(1):77-80.
128. **Miller JH:** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor* 1972.
129. **Bates LS, R.P. W, Teare ID:** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 1973, **39**:205-207.
130. **Ossipow V, Laemmli UK, Schibler U:** A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acids research* 1993, **21**(25):6040-6041.
131. **Letunic I, Bork P:** Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research* 2016, **44**(W1):W242-245.
132. **Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD:** MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics* 2017.
133. **Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L et al:** SWISS-model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research* 2014, **42**(Web Server issue):W252-258.
134. **Delano WL:** The PyMol molecular graphics system. *San Carlos: Delano Scientific* 2002.
135. **Oren A:** Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 1990, **58**(4):291-298.
136. **Teichmann L:** Charakterisierung eines hybriden Systems aus den evolutionär nah verwandten ABC-transportern OpuB und OpuC aus *Bacillus subtilis*. *Philipps-Universität Marburg* 2015, Masterarbeit.
137. **Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, Dubchak I:** The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic acids research* 2014, **42**(Database issue):D26-31.
138. **Broy S:** Das marine Dimethylsulfoniopropionat als protektives Osmolyt und die Evolution verwandter ABC Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten. *Philipps-Universität Marburg* 2015, Dissertation.
139. **Sleator RD, Hill C:** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology reviews* 2002, **26**(1):49-71.
140. **Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Kall L, Elofsson A:** The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic acids research* 2015, **43**(W1):W401-407.
141. **Kümmel H:** Charakterisierung eines neuartigen fusionierten ABC-transporters (OpuF) für osmoprotektiva in der Gattung *Bacillus*. *Philipps-Universität Marburg* 2017, Bachelorarbeit.
142. **Webb BA, Karl Compton K, Castaneda Saldana R, Arapov TD, Keith Ray W, Helm RF, Scharf BE:** *Sinorhizobium meliloti* chemotaxis to quaternary ammonium compounds is mediated by the chemoreceptor McpX. *Molecular microbiology* 2017, **103**(2):333-346.

143. **Aillaud M**: Charakterisierung von GbsR Suppressor Mutanten. *Philipps-Universität Marburg* 2018, Bachelorarbeit.
144. **Opper D**: GbsR: Ein neuer transkriptioneller Repressor in *Bacillus subtilis* zur Regulation des Cholin zu Glycin Betain Biosynthesewegs. *Philipps-Universität Marburg* 2009, Dissertation.
145. **Mohamed Ahmed IA, Eltayeb ME, Mori N, Arima J, Tanaka H, Taniguchi T, Yamanaka N**: Proteomic analysis of homocholine catabolic pathway in *Pseudomonas* sp. Strain a9. *Biochemistry* 2015, **50**:1735-1747.
146. **Dick RM, Freeman JJ, Kosh JW**: *in vivo* acetylation of homocholine and beta-methylcholine in rat brain. *Life sciences* 1985, **36**(12):1183-1188.
147. **Luqmani YA, Sudlow G, Whittaker VP**: Homocholine and acetylhomocholine: False transmitters in the cholinergic electromotor system of torpedos. *Neuroscience* 1980, **5**(1):153-160.
148. **Nelson SH, Benishin CG, Carroll PT**: Accumulation and metabolism of choline and homocholine by mouse brain subcellular fractions. *Biochemical pharmacology* 1980, **29**(13):1949-1957.
149. **Welner SA, Collier B**: Uptake, metabolism, and releasability of ethyl analogues of homocholine by rat brain. *Journal of neurochemistry* 1984, **43**(4):1143-1151.
150. **Chen S, Zhang YE, Long M**: New genes in *Drosophila* quickly become essential. *Science* 2010, **330**(6011):1682-1685.
151. **Conant GC, Wolfe KH**: Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nature reviews Genetics* 2008, **9**(12):938-950.
152. **Hekstra D, Tommassen J**: Functional exchangeability of the ABC proteins of the periplasmic binding protein-dependent transport systems Ugp and Mal of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1993, **175**(20):6546-6552.
153. **Wuttge S, Bommer M, Jager F, Martins BM, Jacob S, Licht A, Scheffel F, Dobbek H, Schneider E**: Determinants of substrate specificity and biochemical properties of the sn-glycerol-3-phosphate ATP binding cassette transporter (UgpB-aec2) of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 2012, **86**(4):908-920.
154. **Nannapaneni P, Hertwig F, Depke M, Hecker M, Mader U, Völker U, Steil L, van Hijum SA**: Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and random forest classification. *Microbiology* 2012, **158**(Pt 3):696-707.
155. **Nicolas P, Leduc A, Robin S, Rasmussen S, Jarmer H, Bessieres P**: Transcriptional landscape estimation from tiling array data using a model of signal shift and drift. *Bioinformatics* 2009, **25**(18):2341-2347.
156. **Hanekop N, Hoing M, Sohn-Böscher L, Jebbar M, Schmitt L, Bremer E**: Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine. *Journal of molecular biology* 2007, **374**(5):1237-1250.
157. **Tschapek B, Pittelkow M, Sohn-Böscher L, Holtmann G, Smits SH, Gohlke H, Bremer E, Schmitt L**: Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein AfProX into its high affinity, closed state. *Journal of molecular biology* 2011, **411**(1):36-52.

158. **Obis D, Guillot A, Gripon JC, Renault P, Bolotin A, Mistou MY:** Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *Journal of bacteriology* 1999, **181**(20):6238-6246.
159. **Wolters JC, Berntsson RP, Gul N, Karasawa A, Thunnissen AM, Slotboom DJ, Poolman B:** Ligand binding and crystal structures of the substrate-binding domain of the ABC transporter OpuA. *PloS one* 2010, **5**(4):e10361.
160. **Schiefner A, Breed J, Bosser L, Kneip S, Gade J, Holtmann G, Diederichs K, Welte W, Bremer E:** Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(7):5588-5596.
161. **Horn C, Sohn-Bösner L, Breed J, Welte W, Schmitt L, Bremer E:** Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *Journal of molecular biology* 2006, **357**(2):592-606.
162. **Oswald C, Smits SH, Hoing M, Sohn-Bösner L, Dupont L, Le Rudulier D, Schmitt L, Bremer E:** Crystal structures of the choline/acetylcholine substrate-binding protein ChoX from *Sinorhizobium meliloti* in the liganded and unliganded-closed states. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(47):32848-32859.
163. **Lang S, Cressatti M, Mendoza KE, Coumoundouros CN, Plater SM, Culham DE, Kimber MS, Wood JM:** YehZYWX of *Escherichia coli* is a low-affinity, non-osmoregulatory betaine-specific ABC transporter. *Biochemistry* 2015, **54**(37):5735-5747.
164. **Lewis M:** The Lac repressor. *Comptes rendus biologiques* 2005, **328**(6):521-548.
165. **Daber R, Stayrook S, Rosenberg A, Lewis M:** Structural analysis of Lac repressor bound to allosteric effectors. *Journal of molecular biology* 2007, **370**(4):609-619.
166. **Pérez-Rueda E, Collado-Vides J:** Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in Archaea and Bacteria. *Journal of molecular evolution* 2001, **53**:172-179.
167. **Wintjens R, Rooman M:** Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *Journal of molecular biology* 1996, **262**(2):294-313.
168. **Birukou I, Seo SM, Schindler BD, Kaatz GW, Brennan RG:** Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon *mepRA* by the MarR family repressor MepR. *Nucleic acids research* 2014, **42**(4):2774-2788.
169. **Alekshun MN, Levy SB, Mealy TR, Seaton BA, Head JF:** The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature structural biology* 2001, **8**(8):710-714.
170. **Collier B, Lovat S, Ison D, Barker LA, Mittag TW:** The uptake, metabolism and release of homocholine: studies with rat brain synaptosomes and cat superior cervical ganglion. *Journal of neurochemistry* 1977, **28**(2):331-339.
171. **Hoffmann T, Warmbold B, Smits SHJ, Tschapek B, Ronzheimer S, Bashir A, Chen C, Rolbetzki A, Pittelkow M, Jebbar M et al:** Arsenobetaine: an ecophysiological important organoarsenical confers cytoprotection against osmotic stress and growth temperature extremes. *Environmental microbiology* 2018, **20**(1):305-323.

172. **Rosenberg J, Yeak KC, Commichau FM:** A two-step evolutionary process establishes a non-native vitamin B₆ pathway in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology* 2018, **20**(1):156-168.
173. **Copley SD:** Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: The patchwork approach. *Trends in biochemical sciences* 2000, **25**(6):261-265.
174. **Näsvall J, Sun L, Roth JR, Andersson DI:** Real-time evolution of new genes by innovation, amplification, and divergence. *Science* 2012, **338**(6105):384-387.
175. **Smith JL, Goldberg JM, Grossmann AD:** Complete genome sequences of *Bacillus subtilis subsp. subtilis* laboratory strains JH642 (AG174) and AG1839. *Genome announcements* 2014, 2:e00663-14.

7. Anhang

<i>B. subtilis</i> OpuBC	1	C	S	L	P	G	L	S	A	A	D	Q	T	I	K	I	G	A	Q	S	M	S	E	S	E	I	I	A	S	M	L	G	Q	L	I	E	H	T	D	L	K	T	T	I	K	N	L	G	S	N	A	V	Q	Q	A	L	M	N	G	E	I	D	I	A	A	T	R	Y	T	72				
<i>B. subtilis</i> OpuCC	1	C	S	L	P	G	L	G	G	A	S	D	D	T	I	K	I	G	A	Q	S	M	T	E	S	E	I	V	A	N	M	I	A	Q	L	I	E	H	D	T	D	L	N	T	A	L	V	K	N	L	G	S	N	Y	V	Q	H	Q	A	M	L	G	D	I	D	I	S	A	T	R	Y	S	72	
<i>B. subtilis</i> OpuBC	73	G	D	A	L	T	G	T	L	R	M	E	P	E	K	D	P	K	A	L	A	L	T	Q	R	E	F	K	K	R	Y	D	L	K	W	Y	D	S	Y	G	F	D	N	T	Y	A	F	T	V	S	K	E	L	A	D	Q	Y	H	L	E	T	V	S	D	V	K	K	W	A	P	Q	L	144	
<i>B. subtilis</i> OpuCC	73	G	D	L	T	S	T	L	G	K	E	A	E	K	D	P	K	K	A	L	N	I	V	Q	N	E	F	Q	K	R	F	S	Y	K	W	F	D	S	Y	G	F	D	N	T	Y	A	F	T	V	T	K	K	F	A	E	K	E	H	I	N	T	V	S	D	L	K	K	N	A	S	Q	Y	144	
<i>B. subtilis</i> OpuBC	145	K	L	G	V	D	N	Y	M	M	K	L	K	G	N	G	Y	Q	D	F	T	K	T	Y	G	M	T	F	G	G	T	Y	P	M	Q	I	G	L	V	Y	D	A	V	K	S	G	K	M	D	I	V	L	A	Y	S	T	D	G	R	I	K	S	Y	G	L	K	M	L	K	D	D	K	Q	216
<i>B. subtilis</i> OpuCC	145	K	L	G	V	D	N	A	M	L	K	R	K	G	D	G	Y	K	G	F	V	S	T	Y	G	F	E	F	G	T	T	Y	P	M	Q	I	G	L	V	Y	D	A	V	K	N	G	K	M	D	A	V	L	A	Y	S	T	D	G	R	I	K	A	Y	D	L	K	I	L	K	D	D	K	R	216
<i>B. subtilis</i> OpuBC	217	F	F	P	P	Y	D	C	S	P	V	V	P	E	K	V	L	K	E	H	P	E	L	E	G	I	I	K	M	L	G	K	I	D	T	A	T	M	Q	E	L	N	Y	E	V	D	G	N	L	K	E	P	S	V	V	A	K	E	Y	L	E	K	H	R	Y	F	E	S	284					
<i>B. subtilis</i> OpuCC	217	F	F	P	P	Y	D	C	S	P	V	I	P	E	K	V	L	K	E	H	P	E	L	E	G	V	I	N	K	L	I	G	I	D	T	E	T	M	Q	E	L	N	Y	E	V	D	G	K	L	K	E	P	S	V	V	A	K	E	F	L	E	K	H	H	Y	F	D	-	283					

Abbildung 54: Sequenzvergleich der SBPs OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis*.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von OpuBC und OpuCC ohne Signalsequenz. Schwarze Pfeile markieren die konservierten Tyrosine, die die aromatische Bindetasche formen. Der rote Pfeil markiert die Position 74, welche ebenfalls an der Bindung der kompatiblen Solute beteiligt ist. Im OpuBC Bindeprotein befindet sich hier ein Aspartat (D) und im OpuCC ein Threonin (T).

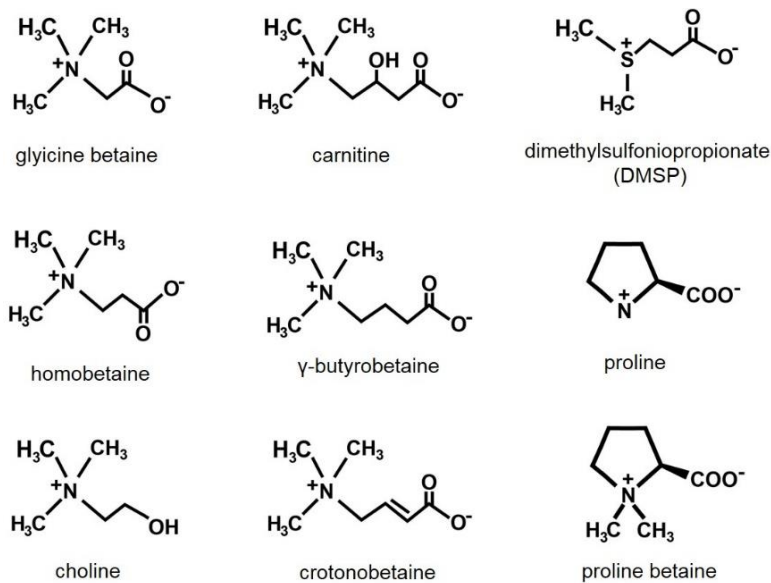


Abbildung 55: Chemische Struktur einiger kompatibler Solute.

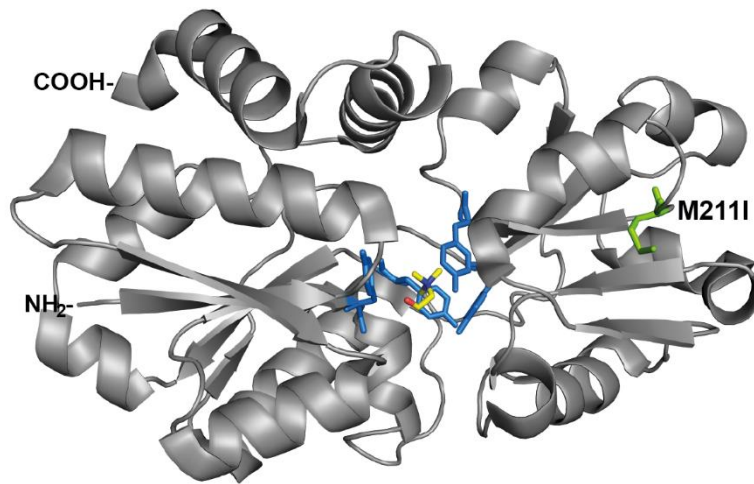


Abbildung 56: Ungewollte Mutation im OpuCC SBP des hybriden ABC Transporters OpuB::OpuCC. Der Stamm LTB1 [Vaterstamm der Suppressor Mutanten LTB3 (GbsR-G³⁹E), LTB4 (GbsR-T⁷⁹A) und LTB5 (GbsR-R⁸⁵S)] besitzt eine ungewollte Mutation im SBP OpuCC des hybriden ABC Transporters (OpuCC-M²¹¹I). Diese liegt am Randbereich des SBP OpuCC (PDB: 3PPP) und hat keinerlei Auswirkung auf den Transport der kompatiblen Solute (Abbildung 57, Tabelle 18). Die Mutation wurde mittels gerichteter Mutagenese zum OpuCC_{wt} Protein.

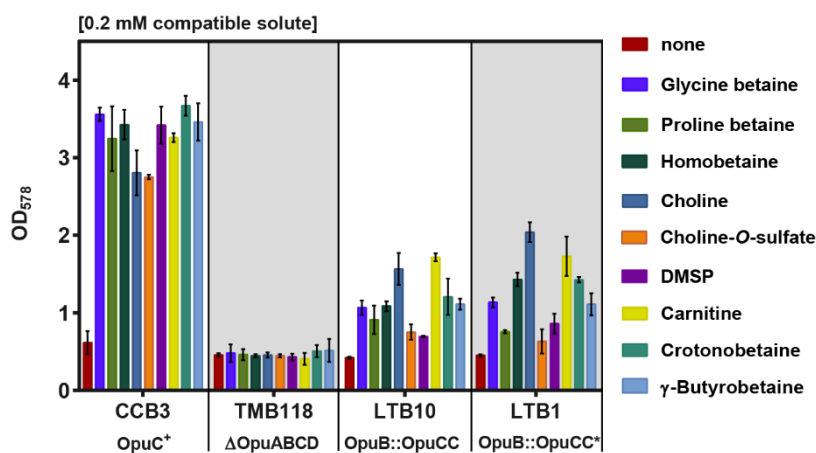


Abbildung 57: Osmoprotektionsassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zum Beweis, dass die ungewollte Mutation OpuCC-M²¹¹I keine Auswirkung hat.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 0.2 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Tabelle 18: Kinetische Parameter der beiden ABC Transporter OpuB::OpuCC und OpuB::OpuCC*.

Stamm	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	K_m (μM)
LTB10 (OpuB::CC)	20 ± 1	6 ± 1
LTB1 (OpuB::CC*)	16 ± 1	9 ± 1

Der Transporter OpuB::OpuCC* trägt die Mutation OpuCC-M²¹¹I, welche aber keine Auswirkung auf den Transport von Glycin Betain hat

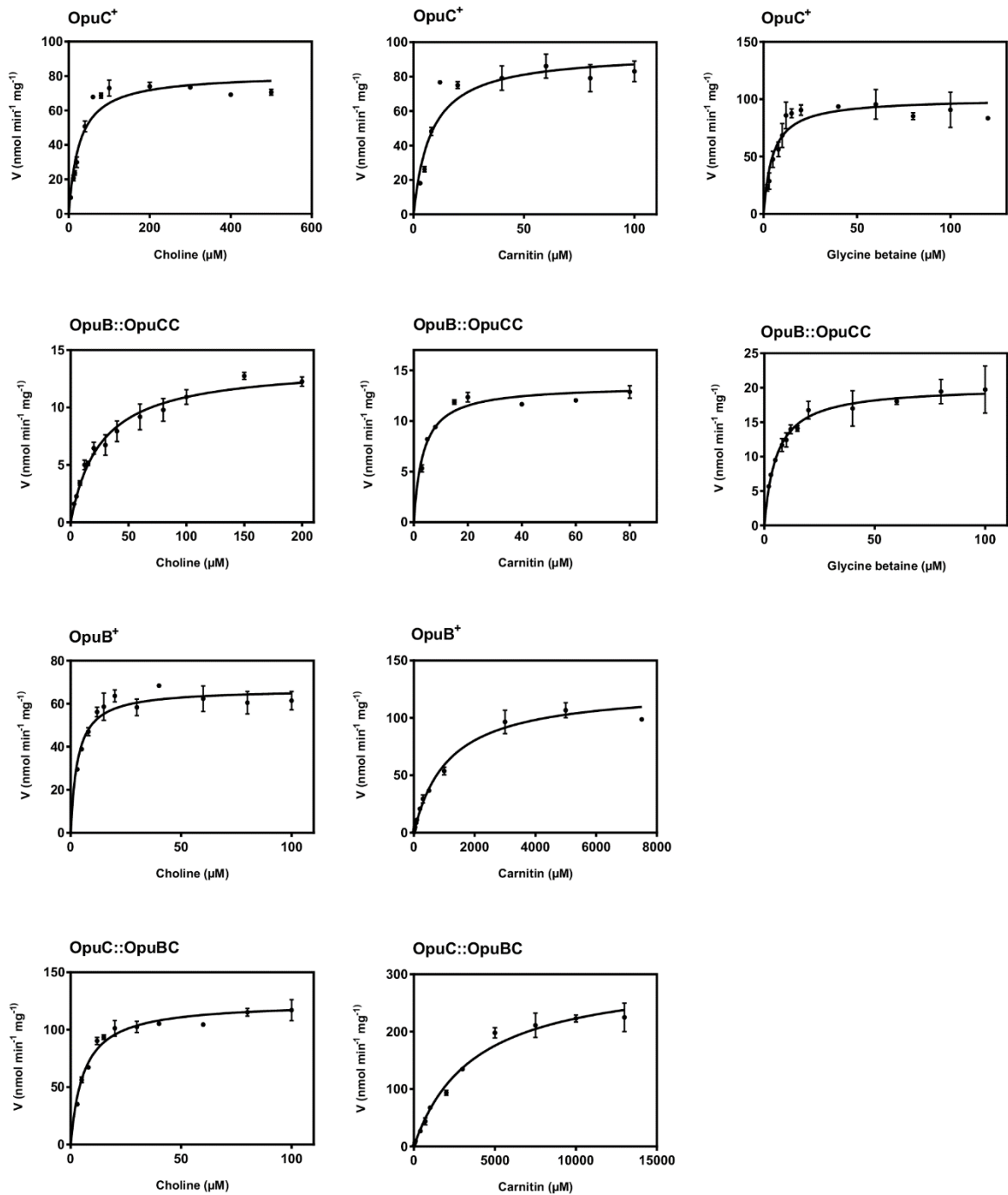


Abbildung 58: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme radioaktiv markierter kompatibler Solute über die Transportsysteme OpuB, OpuC, OpuB::OpuCC und OpuC::OpuBC.

Als Substrate wurden radioaktiv markiertes Cholin (3 μM-0.5 mM), Glycin Betain (3 μM-120 μM) und Carnitin (3 μM-15 mM) genutzt. Über die Michaelis-Menten Kurven wurden die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung.

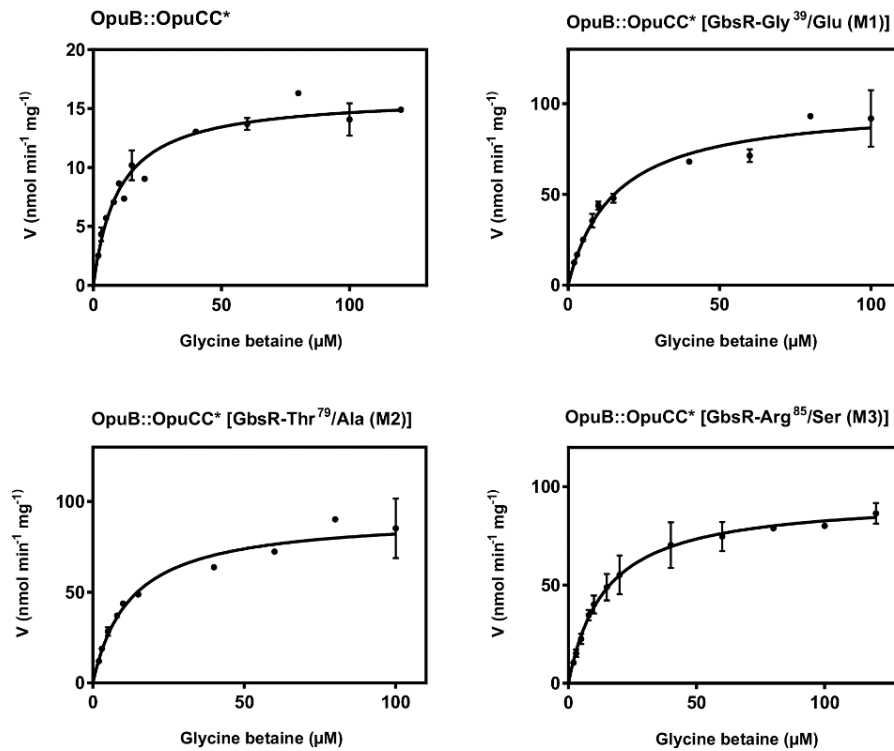


Abbildung 59: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuB::OpuCC* ABC Transporter.

Der Einfluss verschiedener GbsR Mutationen auf die Aufnahme von Glycin Betain über den hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC* (OpuCC-M²¹¹I) ist dargestellt. Über die Michaelis-Menten Kurven wurden die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung.

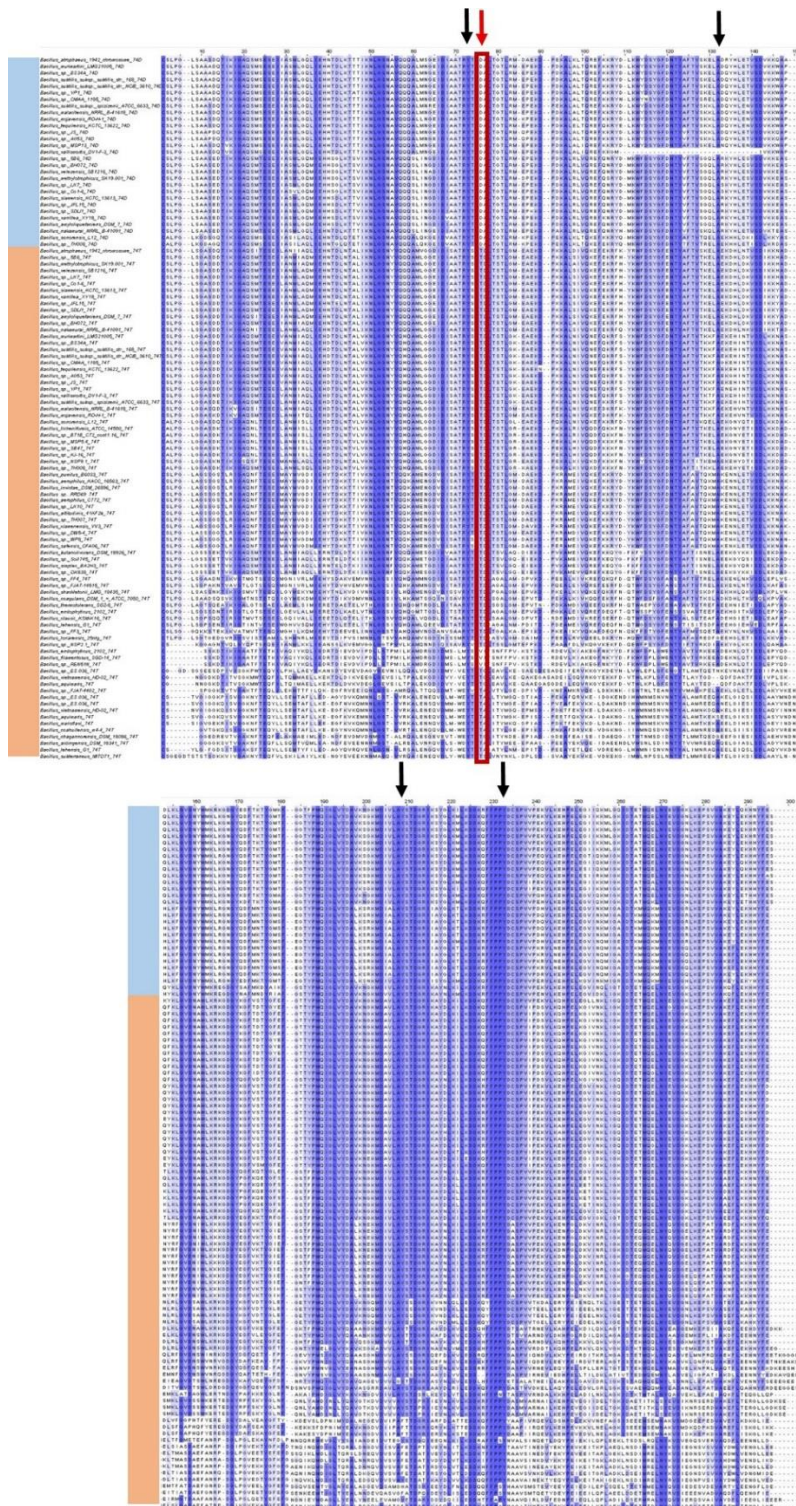


Abbildung 60: Aminosäuresequenzvergleich aller gefundenen OpuBC-Typ und OpuCC-Typ SBPs in der Gattung *Bacillus*.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von OpuBC-Typ (blaue Seitenmarkierung) und OpuCC-Typ (blaue Seitenmarkierung) SBPs ohne Signalsequenz. Schwarze Pfeile markieren die konservierten Tyrosine, die die aromatische Bindetasche formen. Der rote Pfeil markiert die Position 74, welche ebenfalls an der Bindung der kompatiblen Solute beteiligt ist. In den OpuBC Bindeproteinen befindet sich hier ein Aspartat (D) und in OpuCC Proteinen ein Threonin (T). Nur drei OpuCC-Typ Proteine besitzen an dieser Stelle ein Valin.

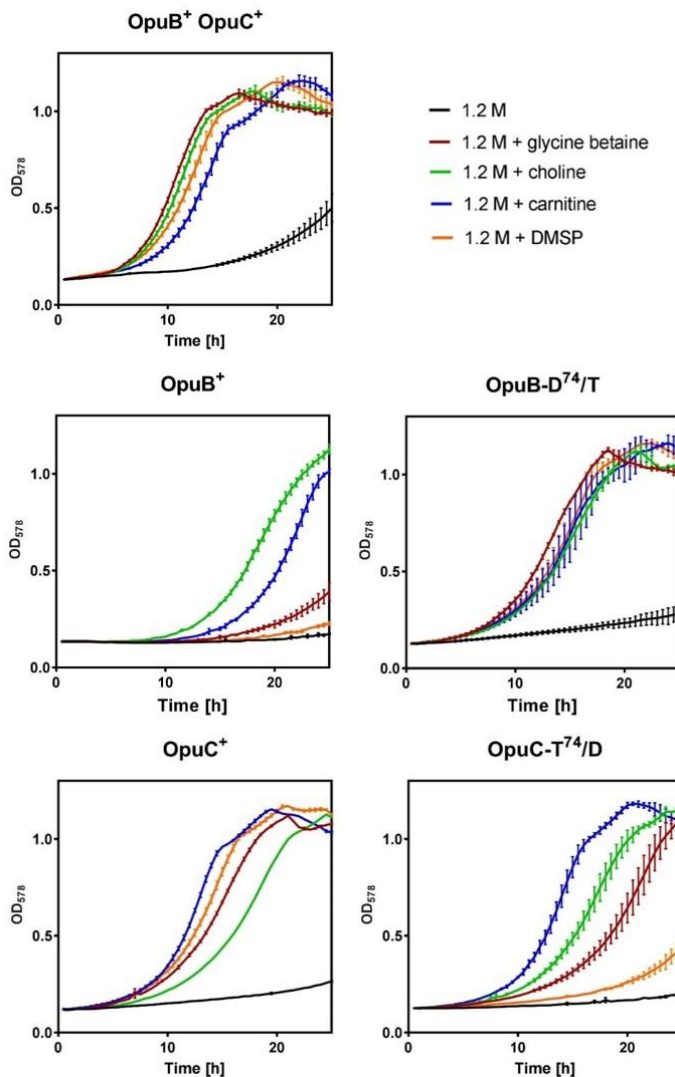


Abbildung 61: Osmotische Protektion von *B. subtilis* Stämmen mit verschiedenen OpuB und OpuC Transporttermutanten.

Die verwendeten *B. subtilis* Stämme besitzen entweder ein intaktes OpuB und OpuC Transportsystem (OpuB⁺OpuC⁺), nur einen der Wildtyp ABC Transporter (OpuB⁺; OpuC⁺) oder ein mutiertes Transportsystem (OpuB-D⁷⁴T; OpuC-T⁷⁴D). Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 30 Stunden in einem MicroplateReader schüttelnd bei 37°C kultiviert und die OD₅₇₈ stündlich photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

Tabelle 19: Berechnung des Volumens in der Bindetasche von OpuBC und OpuBC-D⁷⁴T.

Protein	Ligand	Volumen der Bindetasche (Å ³)	Volumenzunahme (%)
OpuBC wild-type	Cholin	122.957	-
OpuBC-D ⁷⁴ T	Cholin	185.686	51.0
OpuBC-D ⁷⁴ T	Glycin Betain	162.957	32.5
OpuBC-D ⁷⁴ T	Carnitin	184.061	51.0
OpuBC-D ⁷⁴ T	DMSP	162.404	32.1

Die Berechnungen wurden von Herrn Dr. Sander Smits (Universität Düsseldorf) durchgeführt.

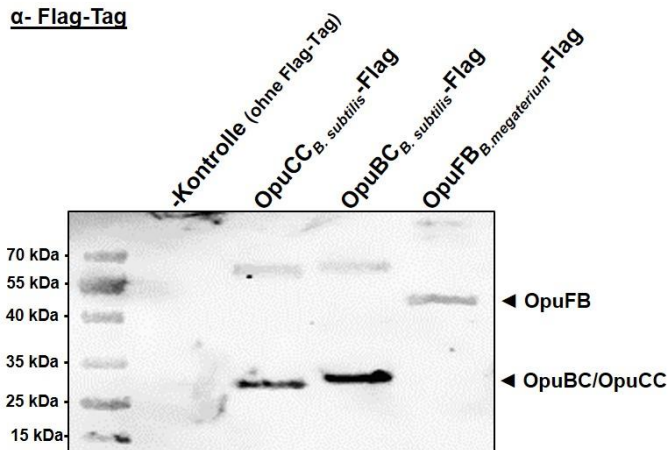


Abbildung 62: Detektion des fusionierten SBPs OpuFB mit Hilfe einer FLAG-Tag Fusion.

Die getesteten *B. subtilis* Stämme HKB33 (OpuCC-FLAG-tag), HKB34 (OpuBC-FLAG-tag) und OpuFB *B. megaterium*-FLAG-tag besitzen eine C-terminale in-frame Fusion des FLAG-tags, welcher mit Hilfe des α -FLAG Antikörpers (Tabelle 12) detektiert werden kann. Der Stamm CAB5 dient als Negativkontrolle, da dieser keinen FLAG-tag besitzt. Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ von 1 kultiviert und die Zellpellets anschließend wie in 3.5.7 beschrieben für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion aufbereitet.

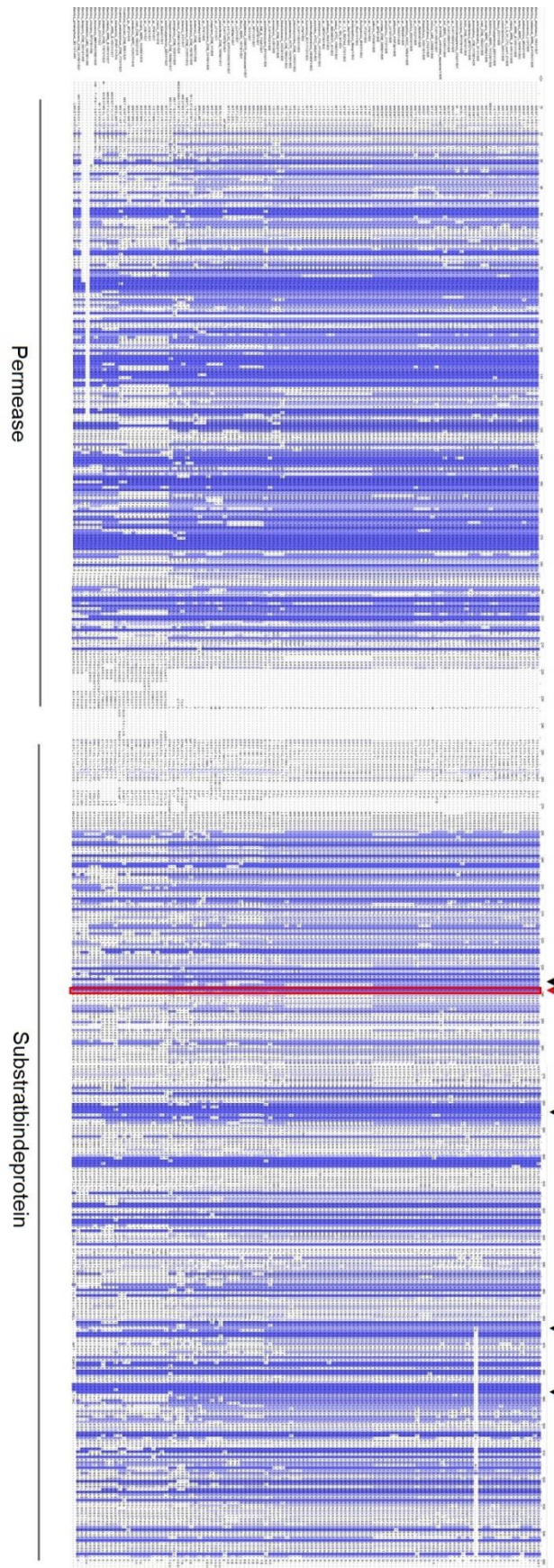


Abbildung 63:
Aminosäuresequenzvergleich aller OpuFB-Typ Proteine der Gattung *Bacillus*.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von allen OpuFB-Typ Proteinen (112) der 175 analysierten Stämmen der Gattung *Bacillus*. Das Protein OpuFB ist ein hybrides Protein aus TMD und SBP Domäne. Schwarze Pfeilspitzen markieren die konservierten aromatischen Aminosäuren, die die aromatische Bindetasche formen. Der rote Pfeilkopf markiert die Position, welche ebenfalls an der Bindung der kompatiblen Solute beteiligt ist (Position 74 der maturen OpuBC/OpuCC Proteine aus *B. subtilis*). In den OpuBC-Typ Bindeproteinen befindet sich hier ein Aspartat (D) und in OpuCC-Typ Proteinen ein Threonin (T). Alle 112 analysierten OpuBF Proteine besitzen an dieser Position ebenfalls ein Threonin (T).

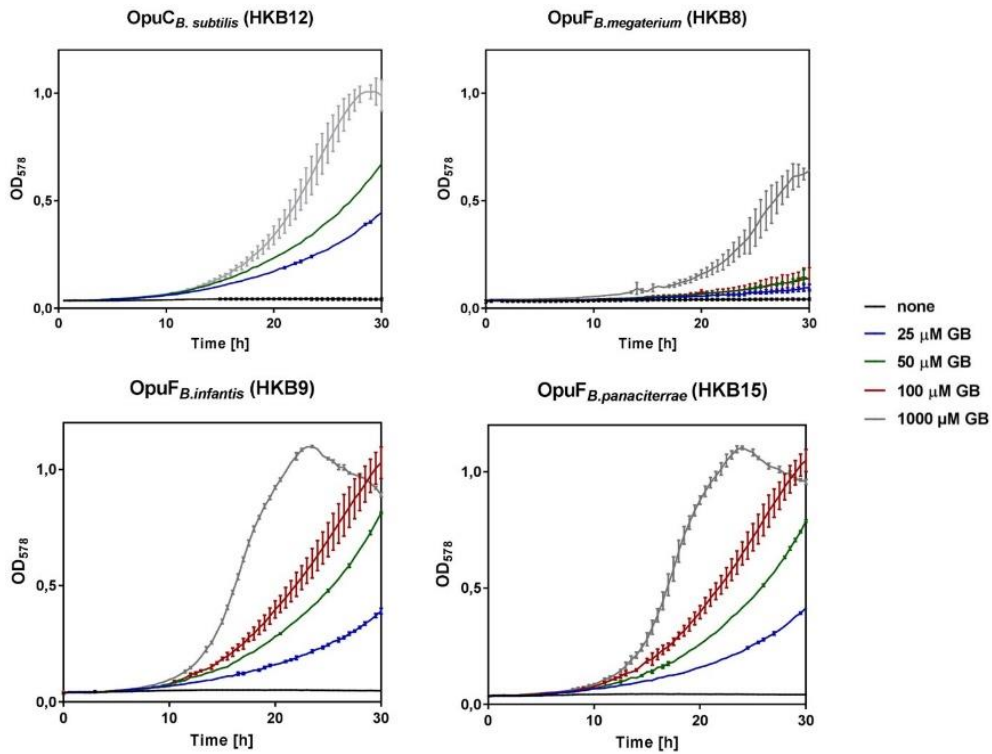


Abbildung 64: Wachstumskurven verschiedener *B. subtilis* Stämme zur detaillierten Analyse der Glycin Betain Aufnahme verschiedener OpuF ABC Transporter.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- und Anwesenheit von 25 µM, 50 µM, 100 µM und 1000 µM Glycin Betain 30 Stunden in einem MicroplateReader schüttelnd bei 37°C kultiviert und die OD₅₇₈ stündlich photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

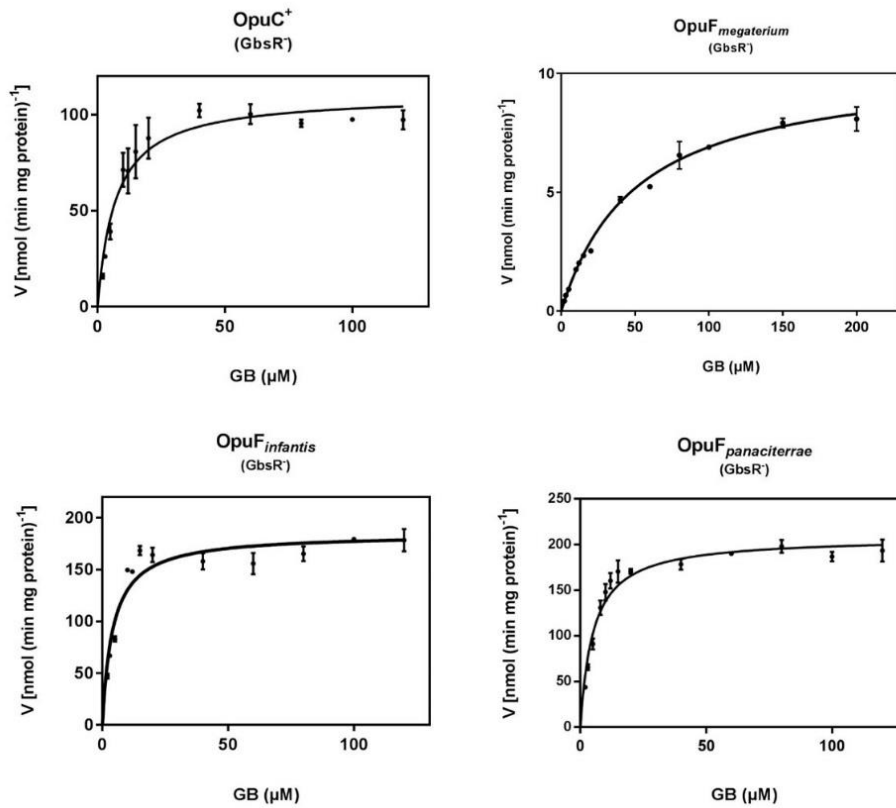


Abbildung 65: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuC und über die OpuF ABC Transporter.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der jeweiligen Transportsysteme wurden die *B. subtilis* Stämme [HKB12 (OpuC⁺), HKB8 (OpuF_{B. megaterium}), HKB9 OpuF_{B. infantis}), HKB15 (OpuF_{B. panaciterrae}) verwendet. Über die Michaelis-Menten Kurven wurden die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung.

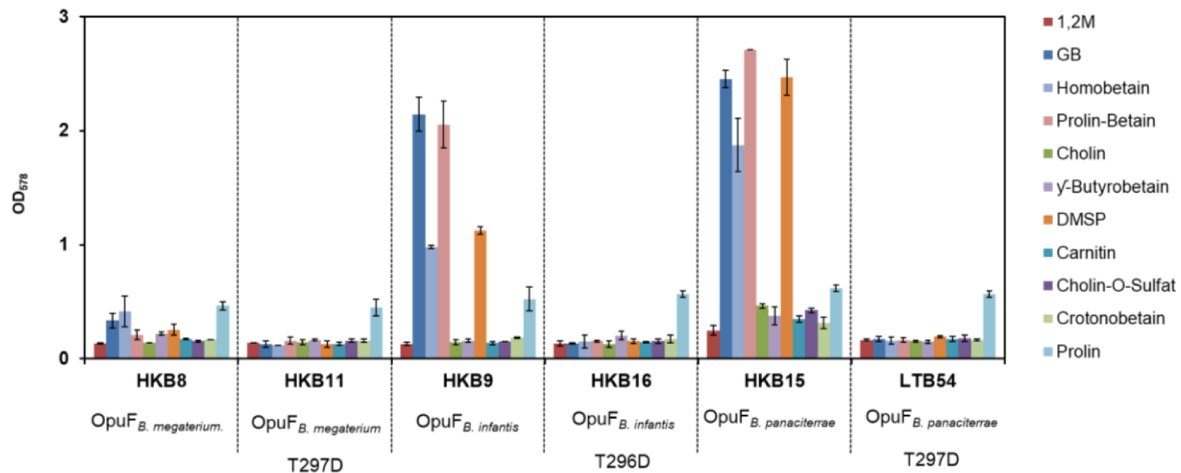


Abbildung 66: Osmoprotektionyassay verschiedener *B. subtilis* Stämme unter hyperosmotischen Bedingungen zur Charakterisierung von mutierten OpuF ABC Transportern.

Die Kulturen wurden in SMM mit 1,2 M NaCl und in Ab- (rot) und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Alle verwendeten Stämme besitzen den spezifischen Prolin Transporter OpuE, weshalb dieses compatible Solut als positive Wachstumskontrolle zugegeben wurde. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

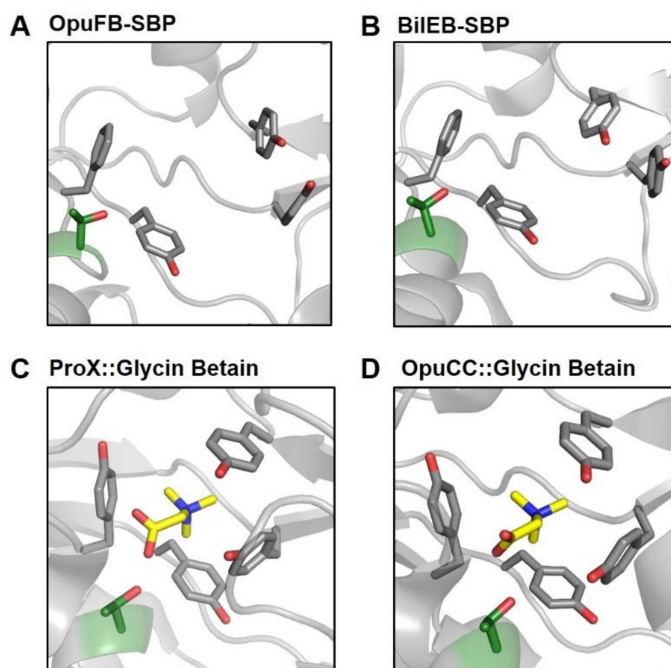


Abbildung 67: Architektur der Substratbindetaschen verschiedener SBPs.

(A) Gezeigt ist ein *in-silico* Modell der Bindetasche des SBPs OpuFB aus *B. infantis*. Die Ausgangsstruktur für dieses Modell ist die Substratbindedomäne von BileB aus *L. monocytogenes* (PDB: 4Z7E) (B). Da dieser ABC Transporter keine Transporteigenschaften für compatible Solute besitzt, ist in der Struktur, und ebenfalls im Modell für OpuFB, kein Substrat vorhanden. (C) Die Kristallstruktur des SBPs ProX aus *A. fulgidus* (PDB: 1SW2) besitzt den Liganden Glycin Betain (gelb). (D) Auch in der Struktur des SBPs OpuCC aus *B. subtilis* (PDB: 3PPP) ist der Ligand Glycin Betain (gelb) vorhanden. In allen vier Ansichten sind die vier aromatischen Aminosäuren und das Threonin an Position 74, welches die Substratspezifität des ABC Transporters determiniert, aufgestellt.

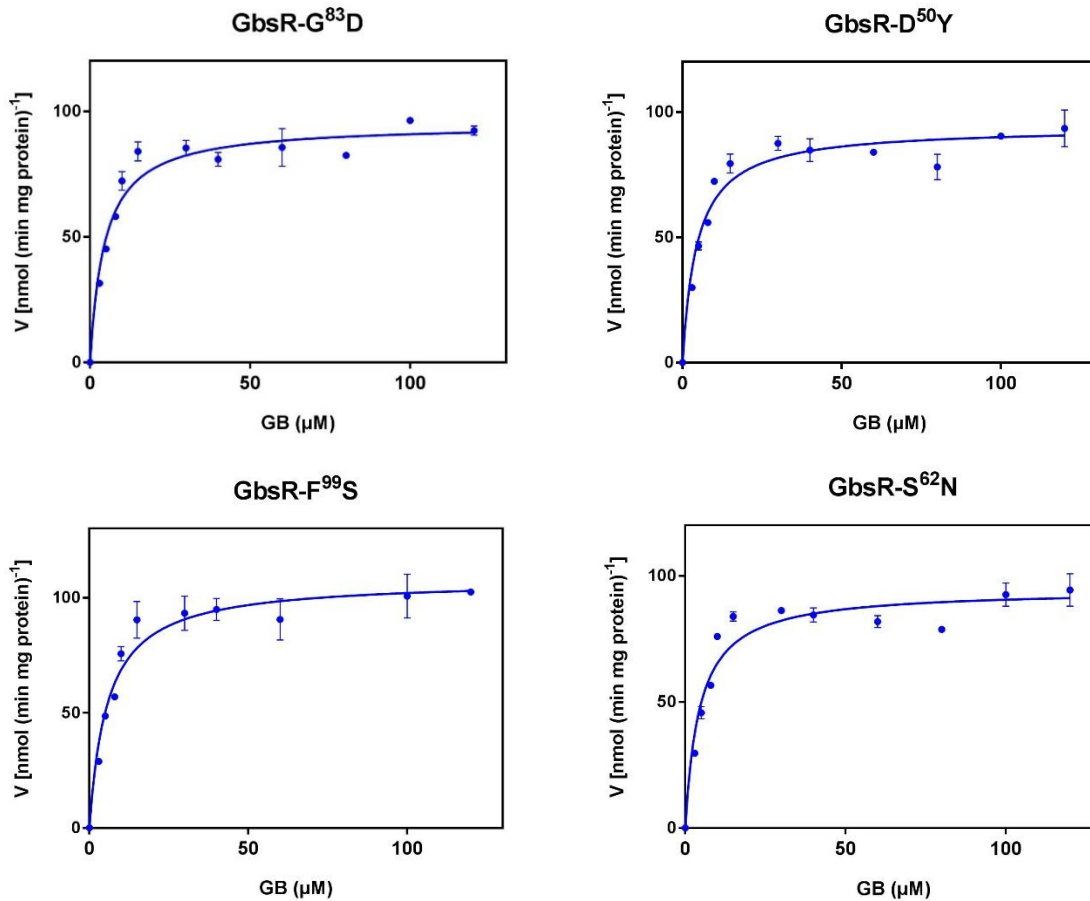


Abbildung 68: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den OpuB::OpuBC in Anwesenheit verschiedener GbsR Mutationen ABC Transporter.

Der Einfluss verschiedener GbsR Mutationen auf die Aufnahme von Glycin Betain über den hybriden ABC Transporter OpuB::OpuCC ist dargestellt. Über die Michaelis-Menten Kurven wurden die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m über einen Fit mit dem Programm GraphPad Prism kalkuliert. Jeder Transport Assay wurde mit zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt und die Standardabweichung

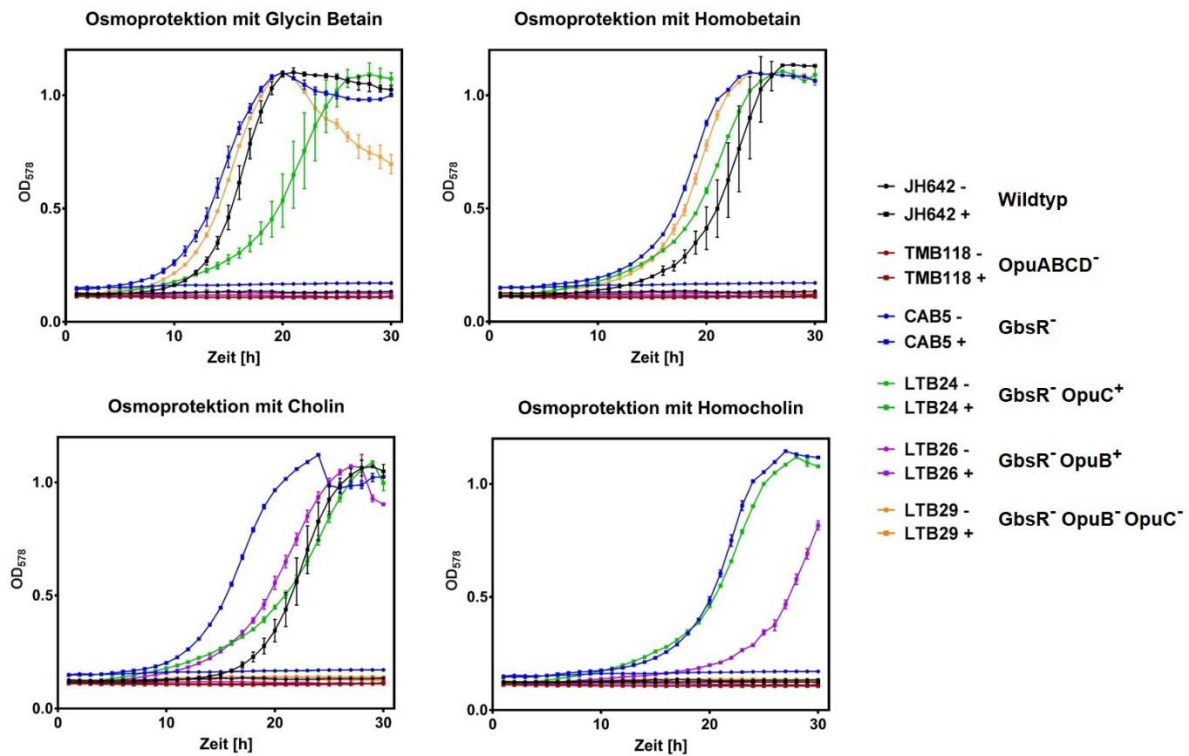


Abbildung 69: Wachstumskurven verschiedener *B. subtilis* Stämme zur detaillierten Analyse der osmoprotektiven Eigenschaft von Homocholin.

Die Stämme wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- und Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute 30 Stunden in einem MicroplateReader schüttelnd bei 37°C kultiviert und die OD₅₇₈ stündlich photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen und zwei technischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

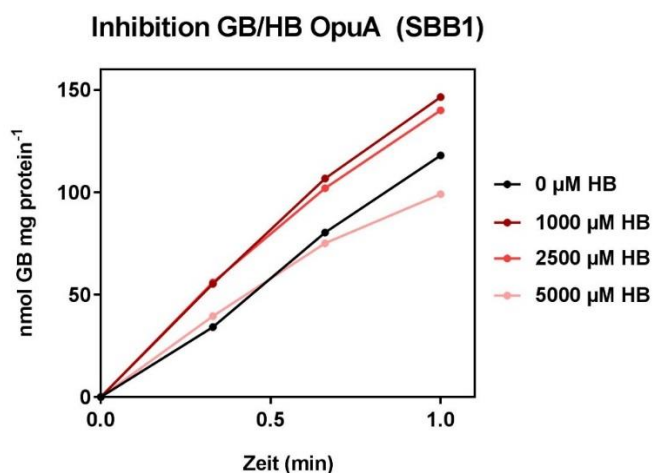


Abbildung 70: Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain über den ABC Transporter OpuA. Aufnahme von radioaktiv markiertem [1-¹⁴C] Glycin Betain des Stammes SBB1 (OpuA⁺) bei der Ab- (schwarz) und Anwesenheit von 1 mM (dunkelrot), 2.5 mM (rot) und 5 mM (hellrot) Homobetain als Inhibitor.

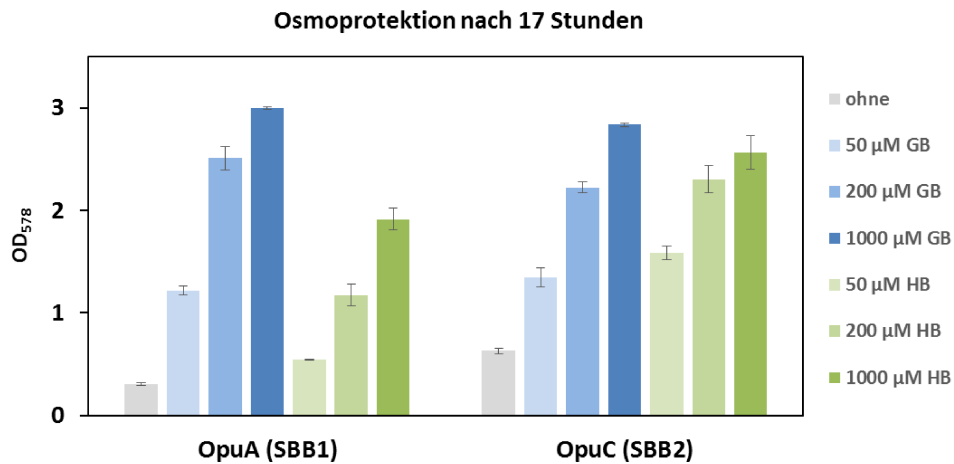


Abbildung 71: Wachstumsvorteil des Stammes SBB2 gegenüber SBB1 unter hyperosmotischen Bedingungen mit verschiedenen Glycin Betain und Homobetain Konzentrationen.

Die Stämme SBB1 (OpuA⁺) und SBB2 (OpuC⁺) wurden in SMM mit 1.2 M NaCl und in Ab- (grau) und Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der kompatiblen Solute Glycin Betain (blau) und Homobetain (grün) 17 Stunden kultiviert und anschließend die OD₅₇₈ photometrisch bestimmt. Die Wachstumsanalyse wurde mit zwei biologischen Parallelen durchgeführt aus denen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ergibt.

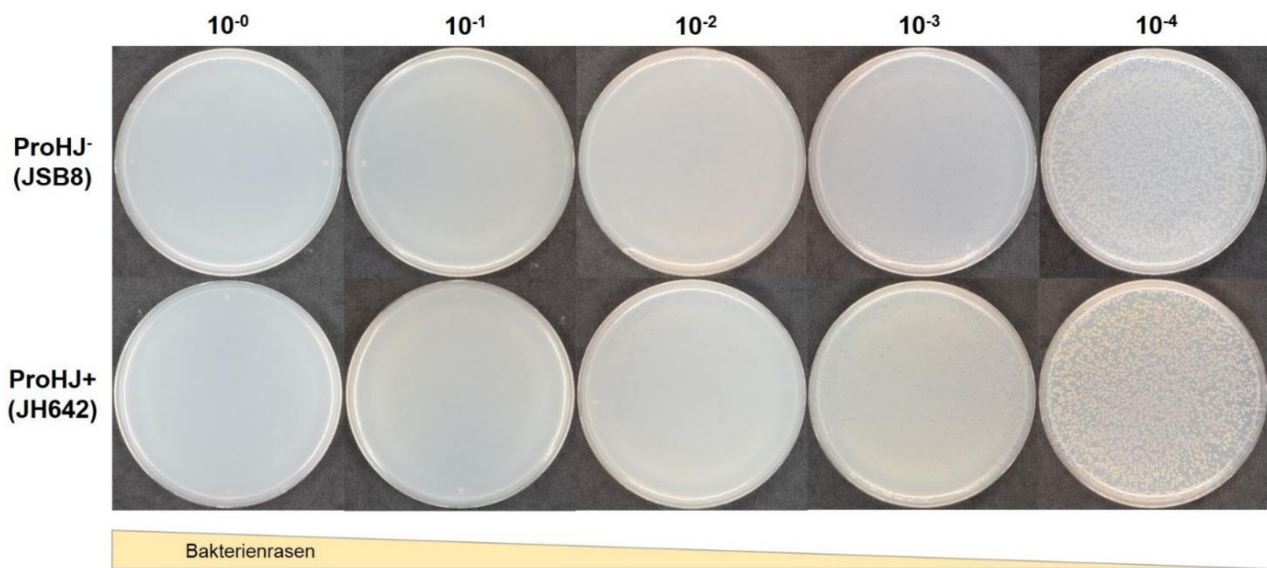
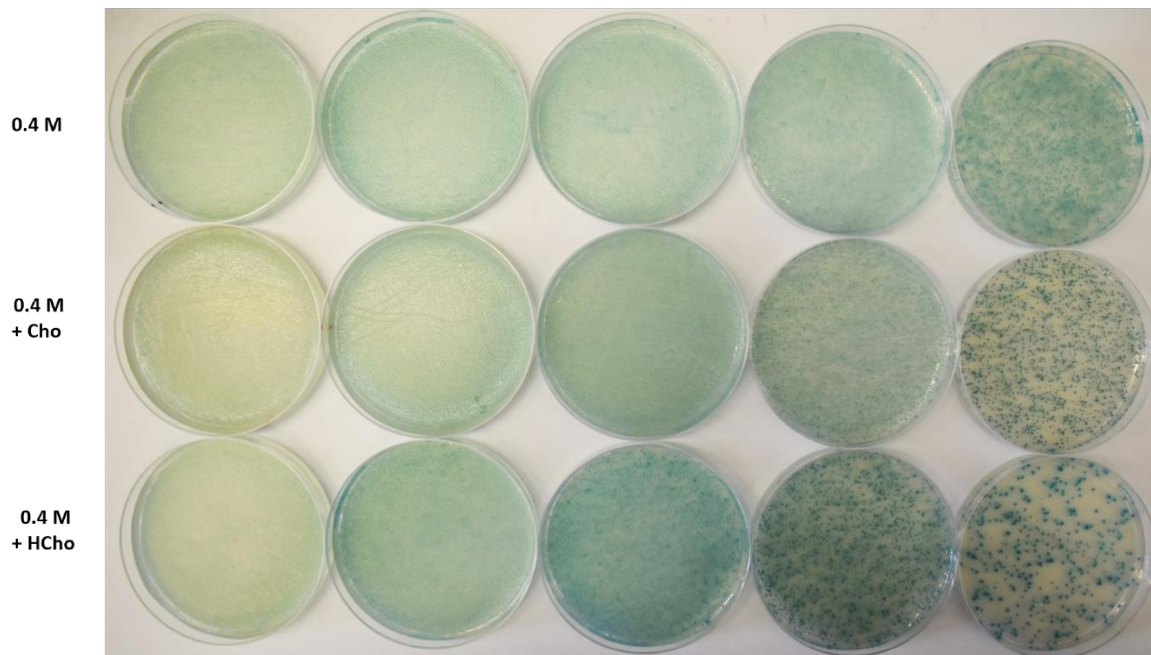


Abbildung 72: Wachstum der Stämme JSB8 und JH642 bei moderater Salzkonzentration.

Die *B. subtilis* Stämme JSB8 (ProHJ⁻) und JH642 (ProHJ⁺) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 2 kultiviert. Es wurde Verdünnungsreihe (10⁰-10⁻⁴) hergestellt und jeweils 100 µl der Kultur auf SMM Agarplatten mit 0.4 M NaCl ausplattiert. Es zeigte sich ein exakt gleiches Wachstum der beiden Stämme.

GbsR⁻ LTB65: $\Delta(lacA::zeo) \Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$ + pGP380 (Leerplasmid)



GbsR⁺ LTB64: $\Delta(lacA::zeo) \Delta(gbsR::kan) amyE::gbsA'-lacZ$ + pLT39 (*gbsR*⁺)

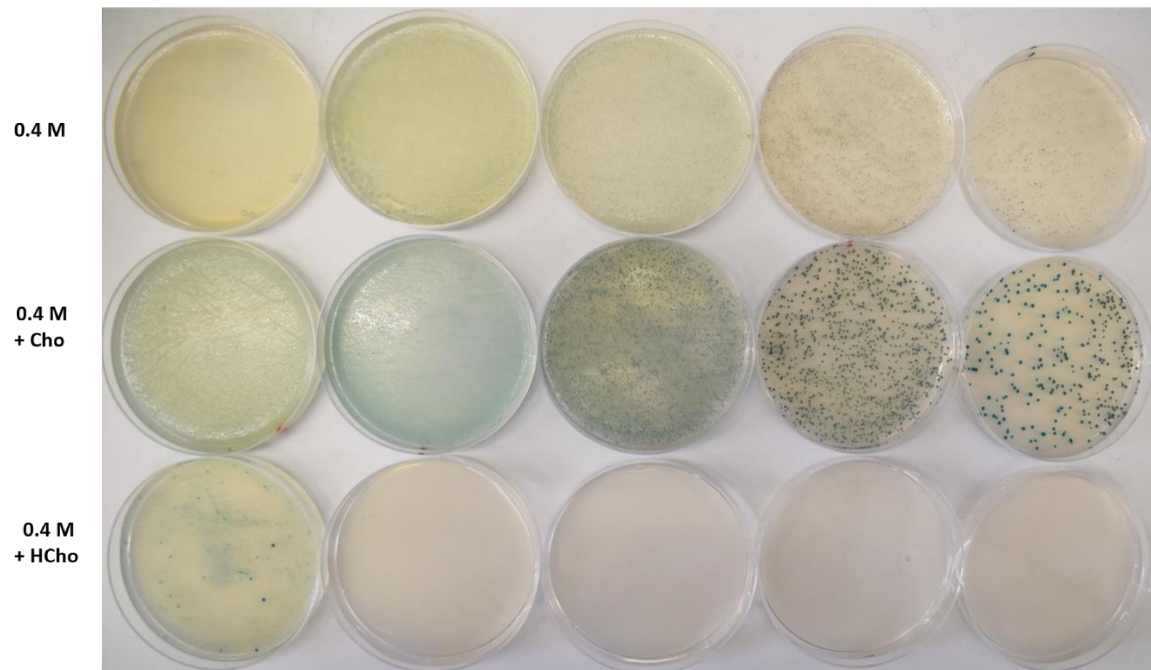


Abbildung 73: Der Einfluss von GbsR auf Wachstum und LacZ-Aktivität.

Die Stämme LTB65 (GbsR⁻) und LTB64 (GbsR⁺) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 2 kultiviert. Es wurde eine Verdünnungsreihe (10⁰-10⁻⁴) hergestellt und jeweils 100 µl der Kultur auf verschiedenen Agarplatten ausplattiert. Alle Medien bestehen aus SMM 0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal, Erythromycin/Lincomycin (Tabelle 5). Im Medium in der jeweils zweiten Reihe befindet sich zusätzlich 1 mM Cholin und im Medium in der jeweils untersten Reihe 1 mM Homocholin. In der obersten Reihe wurde kein Induktor zugegeben. Beide Stämme besitzen eine *gbsA-lacZ* Reportergenfusion.

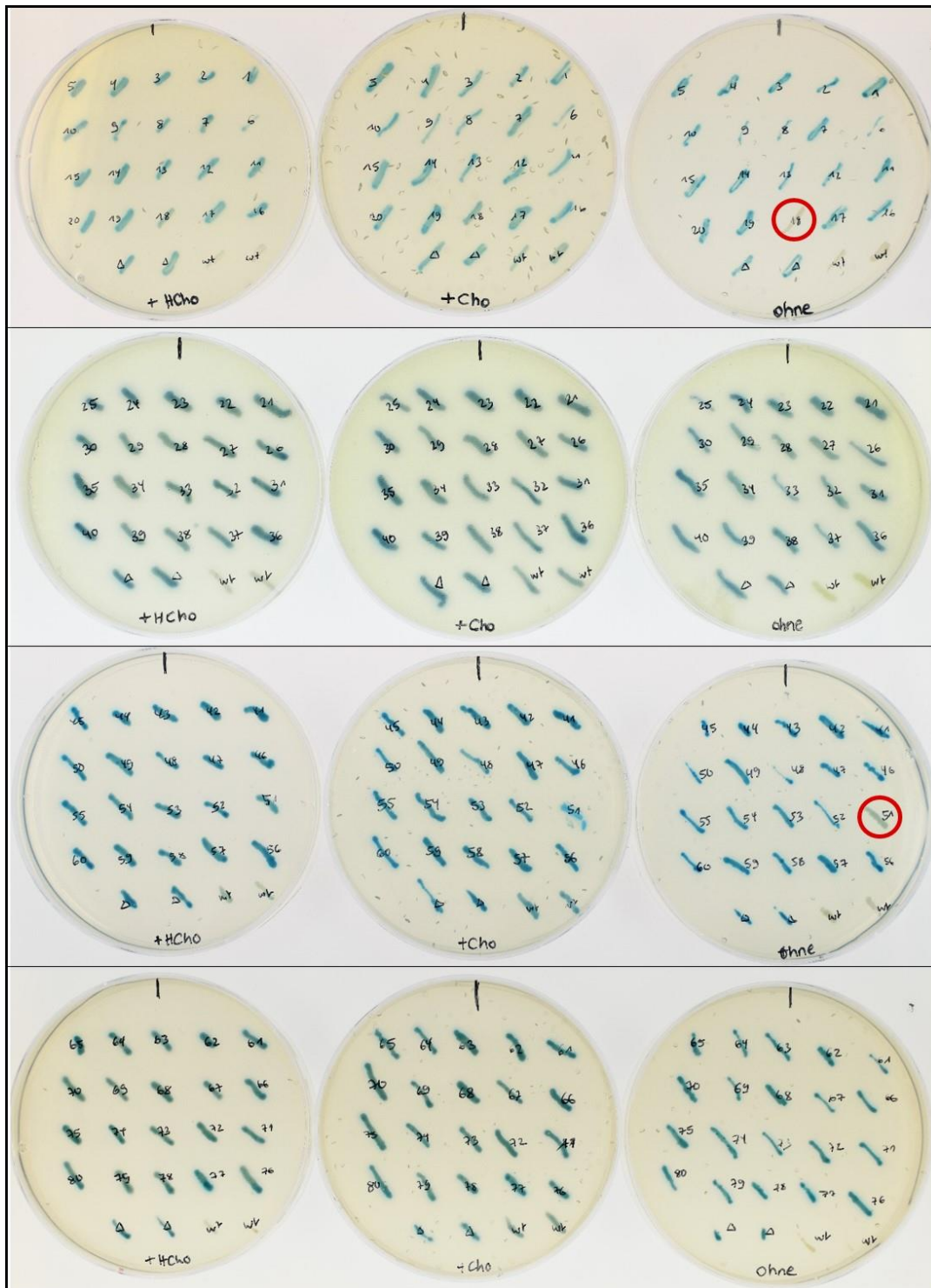


Abbildung 74: Blau-Weiß Screening zur Identifizierung von einer Homocholin induzierbaren GbsR Mutante.

Es wurden 80 verschiedene Klone auf drei unterschiedlichen Medien auf ihre Blaufärbung getestet. Alle Medien bestehen aus SMM 0.4 M NaCl, 1 mM X-Gal, Erythromycin/Lincomycin (Tabelle 5). Im Medium auf der linken Seite befindet sich zusätzlich 1 mM Homocholin und im Medium in der Mitte 1 mM Cholin. Rechts wurde kein Induktor zugegeben. Alle getesteten Klone besitzen eine *gbsA-lacZ* Reportergenfusion und eine Deletion des Gens *gbsR*. Die Stämme wurden dann mit einem Plasmid transformiert, welches entweder kein *gbsR* (Leerplasmid pGP380, Δ), das natürliche *gbsR* (Plasmid pLT39, wt) oder ein zufällig mutiertes *gbsR* (Plasmide pLT39*, 1-80) besaß. Rot umkreist wurden die Klone (18, 51), welche als einzige, neben der Wildtypkontrolle, keine Blaufärbung auf dem Kontrollmedium ohne Induktor aufwies, sodass davon ausgegangen werden kann, dass GbsR intakt ist und *gbsA* reprimiert.

8. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**"Molekulare Autopsie der nah verwandten
ABC-Transporter OpuB und OpuC aus *Bacillus subtilis*"**

selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Es wurde von mir bisher noch keine Dissertation versucht.

.....
Laura Teichmann

.....
Ort, Datum